

**UNIVERSITE MONTPELLIER II –
Dossier présenté en vue d’obtenir le diplôme
d’Habilitation à diriger des recherches**

**« Des parasites humains aux virus animaux,
une histoire de vecteurs »**



Catherine CETRE-SOSSAH

Le 06 Septembre 2010

Composition du JURY

Pr P. DORCHIES	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	Rapporteur
Pr E. THIRY	Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège	Rapporteur
Pr G. DUVALLET	UMR CEFÉ, Université de Montpellier III	Rapporteur
Dr N. TORDO	Institut Pasteur, UBIVE, IFR128, Lyon, France	Examineur
Dr A. DIALLO	Unité FAO/IAEA, Seibersdorf, Autriche	Examineur
Pr M. BERGOIN	UMR 1231, Université de Montpellier II	Président

A mes filles Julie et Marthe,
A mes parents pour ce qu'ils sont et ce qu'ils ont su me donner,
A ces êtres si chers qui sont tout près de moi au quotidien et
sans qui la vie serait bien différente

I have a dream

***Je fais le rêve** que les hommes, un jour, se lèveront et comprendront enfin qu'ils sont faits pour vivre ensemble comme des frères.*

***Je fais encore le rêve**, ce matin, qu'un jour chaque étranger de ce pays, chaque homme de couleur dans le monde entier soit jugé pour sa valeur personnelle plutôt que sur la couleur de sa peau, et que tous les hommes respecteront la dignité de la personne humaine.*

***Je fais encore le rêve** qu'un jour la justice ruisselera comme l'eau et la droiture comme un fleuve puissant.*

***Je fais encore le rêve** aujourd'hui que dans toutes les hautes sphères de l'Etat et dans toutes les municipalités, entreront les citoyens élus qui rendront justice, aimeront la pitié et marcheront ensemble dans les voies de leur Dieu.*

***Je fais encore le rêve** qu'un jour la guerre prendra fin, que les hommes transformeront leurs épées en socles de charrues et leurs lances en ébranchoirs, que les nations ne s'élèveront plus les unes contre les autres et qu'elles n'envisageront plus jamais la guerre.*

***Je fais encore le rêve** que, grâce à cette fois, nous serons capables de repousser au loin les tentations de désespoir et de jeter une nouvelle lumière sur les ténèbres du pessimisme. Oui, grâce à cette foi, nous serons capables de hâter le jour où la paix règnera sur la terre et la bonne volonté entre les hommes.*

Ce sera un jour merveilleux, les étoiles chanteront ensemble et les fils de Dieu pousseront des cris de joie.

***I have a dream** that one day down in Alabama, with its vicious racists, with its governor having his lips dripping with the words of interposition and nullification; one day right down in Alabama little black boys and black girls will be able to join hands with little white boys and white girls as sisters and brothers.*

***I have a dream** that my four little children will one day live in a nation where they will not be judged by the color of their skin but by the content of their character.*

Discours de Martin Luther King, 28 Août 1963

Remerciements

La rédaction de ce mémoire en vue d'obtenir le diplôme d'habilitation à diriger des recherches est, pour moi, une étape dans ma vie professionnelle et me permet de prendre conscience des différentes activités entreprises depuis la soutenance de ma thèse. Je tiens à remercier les différentes personnes qui m'ont accueilli dans leurs unités et équipes de recherche et grâce à qui j'ai pu mener à bien ces recherches, par ordre chronologique : le Pr André Capron, qui m'a accueilli au sein de son unité INSERM U.167 à l'Institut Pasteur de Lille, le Dr W. Evan Secor, qui m'a accueilli au sein de son équipe de Parasitologie, au CDC (Centers for Disease Control and Prevention), à Atlanta, aux Etats-Unis, puis au Dr Francis Derouin au sein de la Faculté de Médecine, à Paris. Enfin, j'ai rejoint le CIRAD en 2002 où j'ai eu et ai toujours beaucoup de plaisir à travailler avec mes différents supérieurs hiérarchiques avec lesquels j'ai énormément appris sur le métier de chercheur de façon générale ainsi que sur les spécificités du métier de chercheur au CIRAD, qu'ils soient ici remerciés de tout cœur : Dr Emmanuel Camus, Dr Dominique Martinez et Dr Emmanuel Albina; si je me sens aujourd'hui capable d'encadrer des recherches, c'est grâce à leur exemple. Je remercie sincèrement ici encore Emmanuel et Dominique qui, en tant que directeur d'unité et chef de l'équipe virologie respectivement, ont toujours soutenu les projets consacrés à la Fièvre Catarrhale Ovine, à la Fièvre de la Vallée du Rift et aux poxviroses. Emmanuel, tes capacités à savoir motiver et faire travailler plusieurs personnes avec des personnalités et des caractères si différents dans une même équipe dans la bonne humeur avec enthousiasme et dynamisme restent pour moi un chemin à suivre. Votre patience, votre diplomatie, votre conscience professionnelle ainsi que votre envie de transmettre à tous les 2 sont des valeurs sûres sur lesquelles je peux m'appuyer pour avancer. J'exprime également ma reconnaissance aux personnes qui ont apporté leur soutien de façon spontanée aux différents projets scientifiques auxquels j'ai eu la chance de participer : à toi, Geneviève pour ton aide spontanée à chaque fois que je frappe à ta porte, à toi Christian pour ton humeur si naturel, à toi Colette pour m'avoir initié au monde la fièvre catarrhale ovine, Thierry, sans toi, les activités moléculaires sur les Culicoides n'auraient peut être jamais été initiées, à vous Jean-Claude et Thomas pour avoir su les maintenir, que serions nous joueurs de pipettes sans nos entomologistes taxonomistes. Toutes mes félicitations et mes encouragements se tournent vers mes premiers thésards qui ont su me supporter et me supportent encore au quotidien pour certains: Aurélie Perrin, Bruno Mathieu et Emna Fakhfakh. Merci à tous les 3 pour la patience

dont vous avez fait/faîtes preuve au quotidien face à mon doux caractère et ma personnalité effacée. Ce manuscrit d'HDR ne serait pas ce qu'il est sans tout le travail et les efforts que vous avez fourni/fournissez avec motivation et enthousiasme. Je souhaite de tout cœur que vous vous épanouissiez dans ce métier de chercheur aussi enrichissant que passionnant. Les multiples questions que vous posez permettent au jeune chercheur que je suis de rester en perpétuel questionnement scientifique.

Je remercie Monsieur le Professeur Bergoin, d'avoir accepté de présider le jury de mon habilitation à diriger des recherches. Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs Dorchies, Thiry et Duvallet pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon dossier.

J'adresse également mes remerciements à Messieurs les Docteurs Tordo et Diallo pour avoir accepté de participer à ce jury.

Les résultats, les projets, les idées que je présente dans ce document ont très largement bénéficié de la contribution de mes collègues chercheurs, techniciens (Cécile, Olivier, Patricia, Vincent, et Aurélie qui nous a rejoint récemment). Qu'ils sentent ici toute ma reconnaissance et en soient remerciés.

Que nos assistantes, Nadège et Denise soient ici remerciées pour leur dévouement et leurs compétences face à mes requêtes. Nono, je tiens aussi à te remercier pour les suivis d'expérimentations animales que tu as toujours su gérer à merveilles, à la demande et avec professionnalisme, valeur devenue rare de nos jours.

A tous ceux qui ont aussi été présents mais dans l'ombre, que je croise de temps à autres sans trouver le temps d'échanger, mais notre récente formation sur la gestion du temps va améliorer sans aucun doute ce comportement.

Enfin, je tiens à remercier pour leur rigueur et leur envie d'apprendre de là où ils sont, mes Ahmed, Abder Hakim, Simon que j'ai eu la chance de pouvoir rencontrer, j'espère que vous êtes toujours en Vie et qu'un jour dans un très proche avenir, je pourrai vous traduire et lire de vive voix ces mots inscrits pour vous dans ce manuscrit.

Carpe diem

Sommaire

Chapitre 1 : Présentation générale	11
1.1 Etat civil	
1.2 Diplômes	
1.3 Activités de recherche et parcours professionnel	
1.4 Compétences	
1.5 Missions d'appui, expertise et participation à projets	
Chapitre 2 : Liste des Publications	16
2.1 DEA, Thèse	
2.2 Articles dans des revues internationales à comité de lecture	
2.3 Autres publications	
2.4 Communications orales invitées	
2.5 Communications orales et affichées	
Chapitre 3 : Présentation des stages encadrés et formations dispensées	23
3.1 Activités d'enseignement	
3.2 Activités d'encadrement	
3.3 Participation à des comités de thèse	
Chapitre 4 : Bilan des activités de recherches	26
Introduction	
<i>4.1 Etude de la réponse immunitaire engendrée lors d'une infection par <i>Schistosoma mansoni</i></i>	28
4.1.1 Le cas de la résistance naturelle du rat à l'infection par <i>S. mansoni</i>	
4.1.2 Le cas d'un modèle murin mimant les formes intestinales modérées et les formes hépatosplénomégaliques sévères de la pathologie	
4.1.3 Le cas des populations humaines coinfectées par <i>S. mansoni</i> et le HIV-1 : impact de la schistosomiase sur la progression de l'infection par le HIV-1	
<i>4.2 Les culicoides et la fièvre catarrhale ovine</i>	32
4.2.1 Historique et répartition	
4.2.2 Les vecteurs	
4.2.3 Analyse phylogénétique des <i>Culicoides</i> basé sur les marqueurs ITS-1	
4.2.4 Développement de tests moléculaires permettant la détection de l'espèce <i>Culicoides imicola</i> , vecteur confirmé de la fièvre catarrhale ovine (FCO) en Corse et des espèces du groupe <i>Obsoletus</i> vectrices de la FCO sur le continent Français	
4.2.4.1 Détection de <i>C. imicola</i>	
4.2.4.2 Détection des espèces du groupe <i>Obsoletus</i>	

4.3 Les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux	42
4.3.1 Classification et épidémiologie des Poxvirus	43
4.3.2 Etiologie du Poxvirus et vaccins	43
4.3.3 Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux	44
4.3.3.1 Propriétés	
4.3.3.2 Les poxvirus en tant que vecteurs d'expression	
4.3.3.3 Les capripoxvirus en tant que vecteurs d'expression	
4.3.4 Etude de faisabilité d'un vaccin capripoxvirus recombinant protégeant contre plusieurs sérotypes de la FCO	48
4.3.4.1 Le virus de la FCO et les vaccins disponibles	
4.3.4.2 Evaluation de l'immunogénicité et de la protection du vaccin capripox recombinant protégeant contre la FCO	
4.3.4.3 Conclusion	
4.3.5 Contribution au développement d'un vaccin capripoxvirus recombinant contre la fièvre de la vallée du Rift (FVR) et la Peste des petits Ruminants (PPR)	55
4.3.5.1 Epidémiologie de la FVR et de la PPR	
4.3.5.2 Le virus de la FVR, et les vaccins actuels	
4.3.5.3 Le virus de la PPR, et ses vaccins	
4.3.5.4 Construction d'un vaccin capripox double recombinant protégeant contre la FVR et la PPR	
4.4 Perspectives	62
4.5 Conclusion générale	65
4.6 Références bibliographiques	67
Chapitre 5 : Choix de 5 Publications représentatives jointes au document	80

Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci.* **2008.** 85(2):372-82.

Mathieu B., A. Perrin, T. Baldet, J.C. Delécolle, E. Albina and **Cêtre-Sossah C.** Molecular identification of the *Obsoletus* complex species larvae (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1r DNA multiplex PCR assay: new approach of vector ecology in bluetongue. *Journal of Medical Entomology.* **2007.** 44 (6):1019-1025.

Perrin A., Albina E., Breard E., Sailleau C., Prome S., Grillet C., Kwiatek O., Russo P., Thierry R., Zientara S., **Cêtre-Sossah C.** Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine.* **2007.** 25(37-38):6774-83.

Cêtre-Sossah C., Montesano A, Freeman, G.L. Jr, Wilard MT, Colley, D.G. and W.E. Secor. Early responses associated with chronic pathology in murine schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **2007.** 29(5):241-9.

Perrin A., **Cêtre-Sossah C.**, T. Baldet, J.C. Delécolle, B. Mathieu, E. Albina. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med. Vet. Entomol.* **2006.** 20(2):219-28.

Liste des ABREVIATIONS

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AHSV :African Horse Sickness Virus
ARN : Acide RiboNucléique
CRI : Cross-Reactive Idiotypes
Ct : Cycle threshold
Ecogpt ::*Escherichia coli* guanine phosphoribosyltransferase
EHDV : Epizootic Hemorrhagic Disease Virus
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FCO : Fièvre Cattarhale Ovine
FVR : Fièvre de la Vallée du Rift
GFP: Green Fluorescent Protein
GM-CSF: Granulocyte Macrophage - Stimulating Factor
GUS: beta glucuronidase
HIV: Human Immunodeficiency
HSS: HyperSplenomegaly Syndrome
IF: Immunofluorescence
IFN: Interféron
IgE : Immunoglobuline de type E
IL: Interleukine
ITS: Internal Transcribed Spacer
KS-1 : Kenya Sheep-1
LSDV: Lumpy Skin Disease Virus
LTc: Lymphocytes T cytotoxiques
MET: Microscopie Electronique à Transmission
MSS: Moderate Splenomegaly Syndrome
PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR: Polymerase Chain Reaction
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPR : Peste des Petits Ruminants
PS: Promoteur synthétique
R-IL8d : Partie flanquante du Récepteur à la chimiokine IL-8 droite
R-IL8g : Partie flanquante du Récepteur à la chimiokine IL-8 gauche
RVF: Rift Valley Fever
SIDA: Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
Th : T helper
TKd: Partie flanquante de la Thymidine Kinase droite
TKg: Partie flanquante de la Thymidine Kinase gauche
TNF : Tumor Necrosis Factor
VLPs: Virus Like Particles
VP1 à VP7 : Viral Protein 1 à 7

LISTE des FIGURES et TABLEAUX

LISTE des FIGURES

Figure 1 : Carte de répartition de la Fièvre Catarrhale Ovine en 2009

Figure 2 - Patrons alaires de *Culicoides obsoletus* et *Culicoides scoticus*

Figure 3 : Localisation des ITS-1 sur l'ADN ribosomal

Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les ITS-1 – (Figure 1 de Perrin *et al.*, 2004)

Figure 5 : Amplification spécifique de 9 espèces différentes du genre *Culicoides*

Figure 6 : Distribution des valeurs de Ct obtenues à partir de 100 pièges à UVs en France continentale en 2004 (indemne de FCO en 2004)

Figure 7 : Courbe ROC obtenue avec les valeurs de Ct de PCR temps réel et la morphologie (considéré comme gold standard)

Figure 8 : Gel d'agarose présentant les amplicons de la PCR multiplex *Obsoletus* groupe

Figure 9 – a-Répartition géographique de la clavelée du mouton et de la variole caprine. Adapté de Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003. b Répartition géographique de la dermatose nodulaire contagieuse. Adapté de Lefèvre & Gourreau, 2003

Figure 10 - Représentation schématique de la structure d'un *Poxvirus*. Adapté de Bertagnoli, 2003

Figure 11 : Représentation schématique de la structure du virus de la FCO

Figure 12 : Carte de restriction du plasmide navette portant le gène VP7 du sérotype 2 pKSCATPSGPT-VP7-FCO2

Figure 13 : Etape de recombinaison homologue

Figure 14 : Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP7

Figure 15 : Représentation schématique du calendrier expérimental des essais capripoxviraux recombinants

Figure 16 : Réponse anti-VP7 et anti-NS3 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants.

a. Expérimentation chèvres, b. Expérimentation moutons

Figure 17 : Scores cliniques obtenus chez les moutons

Figure 18 - Carte de restriction du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7

Figure 19 : Détection par IF de l'expression des protéines VP7 par des cellules OA3.Ts transfectées avec le capripoxvirus double recombinant

Figure 19bis : Expression de l'ARNm lors de l'expression *in vitro* du double recombinant

Figure 20 : Observation au MET de l'expression de la protéine VP7 du virus FCO après transfection avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7

Figure 21 : Observation au MET de possibles pseudoparticules virales du virus de la FCO

Figure 22 : Distribution de la FVR
Figure 22bis : Distribution de la PPR

Figure 23 : Représentation schématique du génome de la souche MP12 de FVR (Flick and Bouloy, 2005)

Figure 24 : La capside des bunyavirus (Thiry, 2007)

Figure 25 : Structure et organisation virale de la PPR

Figure 26 : Positionnement des ATG sur préG₂ et G₂ (G_N) (Figure 1 de Kakach *et al.*, 1988)

Figure 27 : Stratégies de recombinaison pour l'obtention du double recombinant FVR/PPR

Figure 28 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines G2 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-NsmG2

LISTE des TABLEAUX

Tableau 1 - Liste des 33 espèces du genre *Culicoides* impliquées dans la transmission de la FCO

Tableau 2 - Classification de la sous-famille des *Chordopovirinae*

Tableau 3 : Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO

CHAPITRE 1 :
PRESENTATION GENERALE

1.1 Etat civil

Catherine CÊTRE épouse SOSSAH

Née le 30 Mai 1970 à Dijon (21)

NATIONALITE : Française

SITUATION FAMILIALE: En couple, deux enfants

ADRESSE PROFESSIONNELLE UMR 15 CIRAD, UMR INRA 1309 Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes TA A-15/G Campus International de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5-France

TELEPHONE : 04 67 59 39 11

TELECOPIE : 04 67 59 37 98

ADRESSE ÉLECTRONIQUE : catherine.cetre-sossah@cirad.fr

1.2 Diplômes

- **1988 : Baccalauréat Série D**, Lycée Notre-Dame de Mont Roland, Dole (Jura, 39).
- **1991 : BTS Biochimie Analyses Biologiques.**
Ecole Nationale de Chimie Physique Biologie, Paris (Ile de France, 75).
- **1992 : Diplôme de Biotechnologiste européen**, spécialité Culture de Tissus et Cellules Bac +3, Université de Bourgogne, Dijon (Côte d'Or, 21).
- **1993 : Certificat de Capacité pour effectuer des prélèvements sanguins**
Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales -DDASS (Gard, 30)
- **1994 : Maîtrise de Biochimie, obtenue en Formation Continue.**
Université des Sciences et Techniques du Languedoc - Montpellier II (Hérault, 34).
- **1995 : Diplôme d'Université (DU) en Médecine Tropicale.**
Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (Ile de France, 75).
- **1996 : Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Parasitologie** option Biologie Cellulaire et Moléculaire, Immunologie, Faculté de Médecine Henri Warembourg – Université de Lille II (Nord, 59).
- **1997 : Diplôme d'Université (DU) de Virologie Médicale.**
Faculté de Médecine St Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (Ile de France, 75).
- **1999 :Thèse de Doctorat de 3ème cycle de l'Université de Droit et de la Santé, Lille II,** Faculté de Médecine Henri Warembourg - Université de Lille II (Nord, 59).
Spécialité Parasitologie option Biologie Cellulaire et Moléculaire, Immunologie. Soutenue le 8 Novembre 1999 avec la mention très honorable avec Félicitations du Jury. Financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) Institut Pasteur de Lille, INSERM U.167, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Nord, 59)
- **2002 :Diplôme d'Université (DU) de Santé publique.** Option Santé publique et communautaire. Faculté de Médecine- Ecole de Santé Publique, Nancy (Moselle, 54)
- **2006: Certificat en expérimentation animale de Niveau I**, ENVt, Toulouse (Garonne, 31)

1.3 Activités de recherche et parcours professionnel

• **Août 1992 à Septembre 1995 : Assistante de recherche (Recherche et Développement).**

- Construction de vecteurs plasmidiques permettant l'expression de protéines recombinantes et d'anticorps monoclonaux en cellules eucaryotes d'invertébrés en vue d'une production à grande échelle, utilisations en thérapie.

Lieu: Protéine Performance, Station de Recherche INRA-CNRS, Saint Christol les Alès (30), France.

Responsables scientifiques: Pr Gérard Devauchelle, Dr Michel Kaczorek et Dr Hassan Chaabihi.

• **Décembre 1995 à Février 2000 : DEA et Doctorat de 3ème cycle de Parasitologie-Immunologie** option Biologie Cellulaire et Moléculaire, Immunologie. Soutenu le 08 Novembre 1999.

Mots-clés : *Schistosoma mansoni*, réponse immunitaire, rat, cytokines, isotypie.

- Analyse du profil des cytokines impliquées à l'infection et à la réinfection par *Schistosoma mansoni* au niveau génique et protéique et analyse du profil isotypique.

- Etude de l'implication de ces cytokines dans la résistance naturelle du rat à l'infection par *S. mansoni*.

Lieu: Institut Pasteur de Lille, INSERM U.167, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire.

Directeur et tuteur scientifique: Pr André Capron et Dr Jamal Khalife.

• **Mars 2000 à Mars 2002 : Postdoctorat (Parasitologie, Immunologie, Virologie). Financé par la Fondation pour la Recherche Médicale/ Ministère des Affaires Etrangères/ Environment Protection Agency (EPA)**

Mots-clés : coinfections, HIV, *Schistosoma mansoni*, populations humaines, réponse immunitaire *Enterocytozoon bienewi*, *Leishmania donovani*.

- Etude de l'impact, en terme de profil immunitaire, de la schistosomiase à *S. mansoni* sur la progression de l'infection par le HIV-1 chez des populations humaines coinfectées par ces 2 pathogènes au Kenya.

- Analyse de la réponse immunitaire engendrée dans le cas de l'infection par *S. mansoni* dans un modèle murin mimant les formes intestinales modérées et les formes hépatosplénomégaliennes sévères de la pathologie

- Epidémiologie moléculaire (étude des polymorphismes des gènes CCR-5, RANTES et CCR-2)

- Identification d'un modèle animal pour les infections à *Enterocytozoon bienewi* et développement d'outils moléculaires et immunologiques pour un meilleur diagnostic

- Mise en place et réalisation d'une étude épidémiologique sur la prévalence des leishmanioses viscérales au Bangladesh

Lieu: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)/ National Center for Infectious Diseases (NCID)/ Division of Parasitic Diseases (DPD)/ Immunology Branch, Atlanta, Georgia, USA

Directeur et tuteur scientifique : Dr Daniel G. Colley et Dr W. Evan Secor.

• **Mars 2002 à Août 2002 : Ingénieur de Recherche- Secteur Privé**

Développement et mise sur le marché d'un test permettant l'identification de différents champignons dermatophytes responsables de mycoses cutanées

Lieu : Bioadvance, Polyparc, 15, rue J Jankelevitch, 77184 Emerainville, France

Responsable scientifique : Pr Francis Derouin, CHU Saint Louis, Paris (75), France

• **Août 2002 à ce jour: Chercheur** spécialité **Virologie-maladies vectorielles émergentes**

Mots-clés : maladies émergentes, fièvre catarrhale ovine (orbivirus), fièvre de la vallée du Rift (phlebovirus), poxvirus, vaccin, *Culicoides*

Projet en cours :

- Développement de tests moléculaires pour la détection de *Culicoides*, notamment du sous-genre *Avaritia* tels que *Culicoides imicola* et les espèces du groupe *Obsoletus*, vecteurs confirmés ou suspectés de la fièvre catarrhale ovine (FCO)
- Etude de faisabilité d'un vaccin capripoxvirus recombinant, utilisé comme vecteur viral protégeant contre la FCO
- Etude de faisabilité d'un vaccin capripoxvirus double recombinant contre la fièvre de la vallée du Rift et la Peste des Petits Ruminants

Lieu : CIRAD- Département EMVT (Elevage Médecine Vétérinaire et Tropicale) (du 22.08.2002 au 31.12.2006) puis Département BIOS (Systèmes Biologiques) (à compter du 01.01.2007)–UMR 15- Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes- Campus international de Baillarguet-34398 Montpellier Cedex 05, France

Responsable d'Unité : Dr D. Martinez, Responsable d'équipe : Dr Emmanuel Albina

1.4 Compétences

- Parasitologie, Immunologie (FACS, ELISA, IF)
- Biologie cellulaire (Transfection, multiplication et production virale)
- Virologie (Transfection, Production, Titrage), Biologie moléculaire (Clonage, PCR conventionnelle et en temps réel, alignement, phylogénie)
- Coordination de réseaux, Expertise, Exigences d'un Laboratoire National de Référence accrédité COFRAC

1.5 Missions d'appui, expertise et participation à projets

1.5.1 Missions d'appui et d'expertise

- Atelier de formation au diagnostic de la fièvre de la vallée du Rift, LVAD Mamoudzou, Mayotte, France, du 09 au 20 Novembre 2008.
- Organisation, suivi et encadrement d'expérimentations animales visant à évaluer la protection de vaccins capripoxvirus recombinants pour la PPR, LANAVET (Laboratoire Nationale VEtérinaire), Garoua, Cameroun- du 07 au 19 Mai 2009.
- Atelier Régional de Formation sur la fièvre de la vallée du Rift et l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène au Maghreb, soutenu par la FAO, l'agence espagnole de coopération internationale pour le développement et la république Algérienne démocratique et populaire, Alger, Algérie-du 18 au 22 Juillet 2009.
- Referee pour les revues "Veterinary Parasitology", " Vaccine"; "Journal of Medical Entomology", "Mabs", "Infection, Genetics and Evolution"
- Expert pour la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OIE (Office International des Epizooties)

1.5.2 Participation à projets

Intitulés des projets	Institution	Implication
	Union Européenne FP6-SSPE-CT-2006-044285	Coordinatrice
	Union Européenne FP6-FOOD-CT-2006-016236	Partenaire WP4 (PCR)
	Union Européenne FP7-Coordination Action-211757	Partenaire WP5- RVF
FSP LABOVET	Ministère Affaires Etrangères- FSP 2003-24	Capripox, FCO Cameroun et Algérie
CMCU- Cotutelle Tunisie	Ministère Affaires Etrangères	Partenaire Université El Manar, Tunis
ORBIVAC	Union Européenne FP7-KBBE-2009-1-3-02	Partenaire WP5/WP6/WP11
AVERROES	Union Européenne	Financement Thèse avec Tunisie-Montpellier
Convention FCO- DGAL	Ministère Agriculture et Pêche	Activités de Référence FCO

**CHAPITRE 2 :
LISTE DES PUBLICATIONS**

2.1 DEA, Thèse

- Etude de la réponse immunitaire engendrée au cours de la schistosomiase expérimentale à *Schistosoma mansoni* chez le rat. Mémoire de Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Discipline : Parasitologie-Immunologie, Université de Droit et Santé de Lille II, Faculté de Médecine, Lille, 8 Novembre 1999.
- Analyse du profil cytokines au cours de la schistosomiase expérimentale à *Schistosoma mansoni* chez le rat. Mémoire de DEA Parasitologie, option biologie cellulaire et moléculaire, immunologie. Université de Droit et Santé de Lille II, Faculté de Médecine, Lille, 1996.

2.2 Articles dans des revues internationales à comité de lecture

- [2010-1] Ayari-Fakhfakh E., Ghram A., Bouattour A., Imen Larbi I., Latifa Gribâa-Dridi L., Kwiatak O., Bouloy M., Libeau G., Albina E., **C. Cêtre-Sossah**. First serological investigation of Peste des Petits Ruminants and Rift Valley Fever in Tunisia. The Veterinary Journal. In press.
- [2010-2] **C. Cêtre-Sossah**, A. Giovannini, M. Miranda, M. Baylis, P. Mertens, A. Conte, J. Casal, T. Balenghien, S. Zientara, H. Schwermer, H. Madani, S. Sghaier, Y. Lhor, A. Ertürk, G. Georgiev, JM Sanchez-Vizcaino, M. Patakakis, F. Boinas, G. Venter, B. Hoffmann, K De Clercq, P. Van Rijn, A. Botner, D. Martinez and E. Albina. International network of Reoviruses, Bluetongue and African horse sickness, in the Mediterranean Basin and Europe: MED_REO_NET. Vet Record. In Press.
- [2010-3] **Cêtre-Sossah C.**, Madani H., Nomikou K., Sailleau C., Sadaoui H., Maan S., Maan N., Zientara S., Mertens P., and Albina E. Molecular epidemiology of bluetongue virus serotype 1 isolated in 2006 from Algeria. Submitted to Virus Research.
- [2009-1] **Cêtre-Sossah C.**, Albina E. Rift Valley Fever: veterinarian aspects and impact for human health. Med Trop (Mars). 2009. 69(4):358-61.
- [2009-2] **Cêtre-Sossah C.**, Billecocq A., Lancelot R., Defernez C., Favre J., Bouloy M., Martinez D., Albina E. Evaluation of a commercial competitive ELISA for the detection of antibodies to Rift Valley fever virus in sera of domestic ruminants in France. Prev Vet Med. 2009. 90(1-2):146-9.
- [2008-1] **Cêtre-Sossah C.**, Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. Res Vet Sci. 2008. 85(2):372-82.
- [2008-2] Balenghien T., **Cêtre-Sossah C.**, Grillet C., Delécolle J.C., Mathieu B., Baldet T. Diurnal activity of potential bluetongue vectors in northern Europe. Vet Rec. 2008. 162(10):323-4.
- [2008-3] Baldet T., Delécolle J.C., **Cêtre-Sossah C.**, Mathieu B., Meiswinkel R., Gerbier G. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. Prev Vet Med. 2008. 87(1-2):84-97.
- [2007-1] **Cêtre-Sossah C.**, Montesano A, Freeman, G.L. Jr, Wilard MT, Colley, D.G. and W.E. Secor. Early responses associated with chronic pathology in murine schistosomiasis. Parasite Immunol. 2007. 29(5):241-9.

- [2007-2] Perrin A., Albina E., Breard E., Sailleau C., Prome S., Grillet C., Kwiatak O., Russo P., Thiery R., Zientara S., **Cêtre-Sossah C.** Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*. 2007. 25:6774-83.
- [2007-3] Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle JC., Albina E. and **Cêtre-Sossah C.** Molecular identification of the *Obsoletus* complex species larvae (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1r DNA multiplex PCR assay: new approach of vector ecology in bluetongue. *J. Med. Entomol.* 2007. 44 (6):1019-1025.
- [2006-1] Perrin A., **Cêtre-Sossah C.**, T. Baldet, JC. Delécolle, B. Mathieu, E. Albina. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med. Vet. Entomol.* 2006. 20(2):219-28.
- [2006-2] Ganley-Leal L.M., Mwinzi P.N., **Cêtre-Sossah C.B.**, Andove J., Hightower A.W., Karanja D.M., Colley D.G., Secor W.E. Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans. *Infect Immun.* 2006. 74(4):2169-76.
- [2006-3] Ganley-Leal L.M., Mwinzi P.N., **Cêtre-Sossah C.B.**, Andove J., Hightower A.W., Karanja D.M., Colley D.G., Secor W.E. Higher percentages of circulating mast cell precursors correlate with susceptibility to reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006. 75(6):1053-7.
- [2005-1] Bern C., Hightower A.W., Chowdhury R., Ali M., Amann J., Wagatsuma Y., Haque R., Kurkjian K., Vaz L.E., Begum M., Akter T., **Cêtre-Sossah C.B.**, Ahluwalia IB., Dotson E., Secor W.E., Breiman R.F., Maguire J.H. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2005. (5):655-62.
- [2005-2] Kurkjian K.M., Vaz L.E., Haque R., **Cêtre-Sossah C.**, Akhter S., Roy S., Steurer F., Amann J., Ali M., Chowdhury R., Wagatsuma Y., Williamson J., Crawford S., Breiman R.F., Maguire J.H., Bern C., Secor W.E. Application of an improved method for the recombinant k 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005. 12:1410-5.
- [2004-1] **Cêtre-Sossah C.**, T. Baldet, JC. Delécolle, B. Mathieu, A. Perrin, C. Grillet and E. Albina. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Research.* 2004.35 :325-337.
- [2004-2] Menotti J., M. Machouart, M. Benderdouche, **C. Cêtre-Sossah**, F. Derouin, M. Feuilhade De Chauvin, et C. Lacroix. PCR for diagnosis of dermatophyte and *Scytalidium* spp. onychomycosis. *British Journal of Dermatology.* 2004. 150: 518-519.
- [2003-1] Hammoumi S., Breard E., Sailleau C., Russo P., Grillet C., **Cêtre-Sossah C.**, Albina E., Sanchis R., Pepin M., Guibert J.M., Zientara S. Studies on the safety and immunogenicity of the South African bluetongue virus serotype 2 monovalent vaccine: specific detection of the vaccine strain genome by RT-PCR. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003. 50 :316-21.
- [2000-1] **Cêtre C.**, Pierrot C., Maire E., Lafitte S., Capron A, Capron M. and J. Khalife. Interleukin-13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *European Cytokine Network.* 2000. 11 :241-250.
- [2000-2] Khalife J., **Cêtre C.**, Pierrot C. and M. Capron. Mechanisms of resistance to *Schistosoma mansoni* infection: the rat model. *Parasitology International.* 2000. 49:339-345.

- [1999-1] **Cêtre C.**, Pierrot C., Cocude C., Lafitte S., Capron A., Capron M. and J. Khalife. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. *Infection and Immunity*. 1999. 67: 2713-2719.
- [1999-2] Petitprez K., Khalife J., **Cêtre C.**, Lafitte S., Fontaine J., Capron A. and J.M. Grzych. Cytokine mRNA expression involved in the induction of a mucosal IgA response in the rat. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1999. 49: 14-20.
- [1999-3] Cocude C., Pierrot C., **Cêtre C.**, Fontaine J., Godin A. and J. Khalife. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I. *Parasitology*. 1999. 118: 389-396.
- [1998-1] **Cêtre C.**, Cocude C., Pierrot C., Godin C., Capron A., M. Capron and J. Khalife. *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. 1998. 20:135-142.
- [1998-2] Khalife J., Pierrot C., Cocude C., **Cêtre C.**, Godin C. and A. Capron. Molecular cloning and sequencing of the rat interleukin-12p40 gene. *European Cytokine Network*. 1998. 9: 69-73.
- [1998-3] Pierrot C., Cocude C., **Cêtre C.**, Godin C., Lafitte S. and J. Khalife. Expression of rat interleukin-5 and generation of neutralizing antiserum : comparative study of rat IL-5 produced in *E. coli* and insect cells. *Biological and Biochemical Research Communications*. 1998. 253: 756-760.
- [1997-1] Chaabihi H., **Cêtre C.**, Berne A. A new vector for efficient generation of p10-single-late-promoter recombinant baculoviruses. *Journal of Virological Methods*. 1997. 63: 1-7.
- [1997-2] Cocude C., Pierrot C., **Cêtre C.**, Godin C., Capron A. and J. Khalife. Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology*. 1997. 115: 395-402.
- [1996-1] Guthmann JP., **Cêtre C.**, Suzan F., Darovare S. and F. Morin. Field research, relief work and war : does chloroquinoreistance occur in displaced populations of southern Sudan ? *Tropical Doctor*. 1996. 26 : 89-90.

2.3. Autres publications

- [2007-2] Albina E., Zientara S., Sailleau C., Perrin A., **Cêtre-Sossah C.**, Bréard E. Grillet C. La fièvre catarrhale ovine (bluetongue): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*. 2007. 11 :1-13.
- [2004-2] **C. Cêtre-Sossah**, T. Baldet, A. Perrin, B. Mathieu, J.C. Delécolle, C. Grillet & E. Albina. Molecular detection and ITS-1 phylogeny of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Europe. *Proceedings of the IX European Multicollloquium of Parasitology. Veterinary Italiana*. 2004.40 : 343-346
- [2001-1] Pierrot C., Khalife J., **Cêtre C.**, Capron A., Capron M. Contribution of experimental models to the understanding of immunity to schistosomiasis. *C R Acad Sci III*. 2001. 324 :1133-40.

2.4 Communications orales invitées

C. Cêtre-Sossah and **E. Albina**. La fièvre de la vallée du Rift: Aspects vétérinaires et impacts sur la santé publique- XV ème Actualités du PHARO, Marseille, 17-19 Septembre 2009.

C. Cêtre-Sossah. Les Culicoides et leur rôle dans la transmission de la FCO, Journées Françaises de Virologie, Paris, 23-24 Avril 2009.

C. Cêtre-Sossah. Séminaire OIE (Office International des Epizooties)- Diagnose de la Fièvre de la vallée du Rift- Diagnostic de laboratoire : Echantillonnage, sérologie, isolement du virus et contraintes. Réémergence de la Fièvre de la vallée du Rift : comment mieux prédire et réagir, Bloemfontain, Afrique du Sud, 16 au 18 Février 2009.

C. Cêtre-Sossah . Séminaire FAO (Food and Agriculture Organization, United Nations)- La fièvre de la vallée du Rift- Epidémiologie, Diagnostic et Prévention- 3rd Regional Animal Health Coordination Meeting, Alger, Algérie, 8-10 Février 2009.

C. Cêtre-Sossah. How to diagnose Rift Valley Fever Virus ? Séminaire Régional d'échanges d'informations épidémiologiques en Santé Animale dans le cadre du CRVOI (Centre Régional de Veille de l'Océan Indien), Mayotte 17- 20 Novembre 2008.

C. Cêtre-Sossah. La bluetongue: un exemple de maladie émergente dans le bassin méditerranéen. Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisie, 05 Juin 2006.

C. Cêtre-Sossah. Molecular detection and ITS-1 phylogeny of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Europe, Université de Zurich, Laboratoire de Parasitologie, Zurich, Suisse, April 26, 2005.

2.5 Communications orales et affichées dans des congrès internationaux ou réunions de projets

C. Cêtre-Sossah, A. Perrin and E. Albina. Update on the Generation of recombinant poxvirus vaccines (*Capripoxvirus*) against bluetongue. *Closure Workshop of FSP LABOVET project, Bamako, Mali, 26 to 29 January 2010.*

C. Cêtre-Sossah, A. Billecocq, C. Defernez, J. Favre, M.Bouloy, D. Martinez and E. Albina . Evidence of recent Rift Valley Fever virus circulation in Mayotte, a French island of the Indian Ocean. *Fifth European Viral Zoonosis Meeting, Saint Raphael, France, 26-29 Septembre 2009.*

Ayari-Fakhfakh E., Ghram A., Bouattour A., Larbi I., Gribâa-Dridi L., Kwiatek O., Bouloy M., Libeau G., Albina E., **C. Cêtre-Sossah.** First serological investigation of Peste des Petits Ruminants and Rift Valley Fever in Tunisia. *Fifth European Viral Zoonosis Meeting, Saint Raphael, France, 26-29 Septembre 2009.*

C. Cêtre-Sossah, D. Martinez, E. Albina. Rift Valley Fever virus in Mayotte, a French island of the Indian Ocean, *EPIZONE, Third Annual Meeting, Antalya, Turkey, 12-15 May, 2009.*

C. Cêtre-Sossah, How to diagnose Rift Valley Fever? OIE Regional seminar on « RE-emergence of RVF in Southern Africa:How to better predict and respond? *Bloemfontain, South Africa, February 16-18th, 2009.*

C. Cêtre-Sossah and T. Balenghien. C.obsoletus group ring trials Part of WP2: Regional surveillance of vectors: research in entomology with the Deliverable D2.2. Guide to the identification of *Culicoides* vectors and potential vectors present in the Mediteranean basin, including molecular methods, *Second Annual Meeting projet MEDREONET, Giulianova, Teramo, Italy, 9-11 December, 2008.*

C. Cêtre-Sossah, B. Mathieu, Setier-Rio ML, Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C. and E. Albina Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of Bluetongue (BT) and African Horse Sickness (AHS) in Africa and Europe, *EPIZONE, Second Annual Meeting, Brescia, Italy, 5 June, 2008.*

C. Cêtre-Sossah, A. Perrin and E. Albina. Update on the Generation of recombinant poxvirus vaccines (*Capripoxvirus*) against bluetongue. *4th Annual scientific meeting-Projet FSP LABOVET, Montpellier, 22 Mai 2008.*

B. Mathieu and **C. Cêtre-Sossah**. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola* *First Annual Meeting Projet MEDREONET, Palma de Majorca, Spain, 12-14 December, 2007.*

A. Perrin, E. Albina, E. Bréard, C. Sailleau, S. Promé, C. Grillet, O. Kwiatek, P. Russo, R. Thierry, S. Zientara and **C. Cêtre-Sossah**. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of Bluetongue virus: Evaluation of immune response and protection in small ruminants. *XIIème conférence de AITVM (Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine), Montpellier, France, 20-24 August, 2007*

A. Perrin, E. Albina, P. Russo, R. Thierry, S. Zientara, **C. Cêtre-Sossah**. Recombinant Capripoxvirus used as vaccine against bluetongue. *First Annual Meeting Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control, EPIZONE, Pulawy, Poland, May 30- June 1, 2007.*

C. Cêtre-Sossah, A. Perrin and E. Albina. Generation of recombinant poxvirus vaccines (*Capripoxvirus*) against bluetongue. *Third Scientific committee meeting of the FSP LABOVET Project, Addis Ababa, Ethiopia, 19-20 April, 2007.*

T. Baldet and **C. Cêtre-Sossah**. BTV Vectors in France and Diagnosis of BTV in France. *Meeting on BTV organized by the EU and the Community Reference Laboratory. Brussels, Belgium, 28-29 November, 2006.*

A. Perrin, B. Pignolet, **C. Cêtre-Sossah**, E. Bréard, C. Sailleau, S. Bertagnoli, S. Zientara and E. Albina. "Development of recombinant poxviruses as vaccines to protect small ruminants against bluetongue (BT)." *Congrès « ESVV », European Society for Veterinary Virology, Lisbonne, Portugal 24-27 September 2006.*

A. Perrin, B. Pignolet, **C. Cêtre-Sossah**, E. Bréard, C. Sailleau, S. Zientara, S. Bertagnoli, E. Albina. Development of recombinant poxvirus vaccines (capripoxvirus-leporipoxvirus) to protect small ruminants against all serotypes of bluetongue (BT)-*2nd European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Paris - 4-6 Septembre 2006.*

E. Albina, A. Perrin and **C. Cêtre-Sossah**. Development of recombinant poxvirus vaccines (*Capripoxvirus*) for ruminant vaccination against all serotypes of bluetongue virus. *Second Scientific committee meeting of the PROJECT FSP LABOVET financé par le Ministère des Affaires Etrangères: SUPPORT to 5 AFRICAN VETERINARY LABORATORIES, Bamako, Mali, 3-4 Mai 2006.*

A. Perrin, B. Mathieu, **C. Cêtre-Sossah**, T. Baldet, J.C. Delécolle, C. Grillet, E. Albina. ITS-1 molecular detection of *Culicoides imicola* (Diptera : Ceratopogonidae), the main vector of Bluetongue and African horse sickness in Europe and first results of phylogeny on some mediterranean *Culicoides* species-*3rd workshop of EMCA in Osijek – Croatia, 7-9 October, 2004*

C. Cêtre-Sossah, T. Baldet, A. Perrin, B. Mathieu, J.C. Delécolle, C. Grillet & E. Albina. Molecular detection and ITS-1 phylogeny of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Europe. *MEEGID VII. Valencia, Espagne, 19-22 Juillet, 2004.*

Cêtre C. Cytokine response involved in chronic and severe *Schistosoma mansoni* infection. *Fifth Woods Hole Immunoparasitology Meeting. MBL WoodsHole, MA, USA. 22-25 Avril, 2001.*

CHAPITRE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS

Cêtre C. Role of the type 2 cytokines in the resistance of rat to *Schistosoma mansoni*. *Seminars of the Division of Parasitic Diseases. CDC/ National Center for Infectious Diseases. Atlanta, USA, 20 July, 2000.*

Cêtre C. Cytokine response involved in chronic and severe *Schistosoma mansoni* infection. American Society of Tropical Medicine, *Fourth Woods Hole Immunoparasitology Meeting. MBL WoodsHole, MA, USA, 29 October-02 November, 2000.*

Cêtre C., Capron A., Capron M and J. Khalife. Role of the type 2 cytokine in the resistance of rat to *Schistosoma mansoni*. *10th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium. Athens, Georgia, USA, 10 May, 2000.*

Pierrot C., **Cêtre C., Capron A., Capron M. and J. Khalife.** Molecular cloning and characterisation of rat IL-13 α 1 receptor : expression by B cells and its implication in IgE production. *Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie. Lille, France, 24-26 Novembre, 1999.*

Khalife J., **Cêtre C., Pierrot C., Capron A. and M. Capron.** The helminth *S. mansoni* induces a type 2 cytokine response in rat: expression and role of IL-13 et Molecular cloning and characterisation of rat IL-13 receptor : expression by B cells and its implication in IgE production. *International Society for interferon and cytokine research, Paris, France, 5-9 Septembre, 1999.*

Cêtre C., Capron A., Capron M. and J. Khalife. The helminth *Schistosoma mansoni* induces a Type 2 cytokine response in rat: expression and role of IL-13. *Third Woods Hole Immunoparasitology Meeting. MBL WoodsHole, MA, USA. 2-5 May, 1999.*

Cêtre C. Immune response involved in *Schistosoma mansoni* infected Fischer rats. Troisième Journée des Jeunes Chercheurs. Institut Pasteur de Lille-Institut de Biologie de Lille, Lille, France, 4 Mai 1999.

Cêtre C., Capron M., Capron A. and J. Khalife. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after a primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. British Society for Parasitology. Spring Meeting, University of Warwick, U.K., 11-14 april, 1999.

Khalife J., **Cêtre C., Pierrot C., Cocude C., Capron A. and M. Capron.** Predominant Th2-type response after infections of rats with *Schistosoma mansoni*. Keystone symposia on molecular and cellular biology. Type 2 cytokines in Allergy and Helminth Infections. Incline Village, Nevada, USA, 9-15 January, 1999.

Khalife J., **Cêtre C., Pierrot C., Cocude C., Capron A. and M. Capron.** Expression prédominante d'une réponse Th2 dans la schistosomiase du rat. Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie. Paris, France, 25-27 Novembre 1998.

Cêtre C., Cocude C., Pierrot C., Godin C., Capron M., Capron A. and J. Khalife. Study of cytokine mRNA expression in experimental rat schistosomiasis. Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie. Marseille, France, 26-28 Novembre 1997.

Cêtre C. and Guthmann JP. Does chloroquino-resistance occur in displaced populations of southern Sudan? Molecular Epidemiolgy and evolutionary genetics of pathogenic micro-organisms (MEEGID), Montpellier, France, 26-28 Mai 1997.

Pierrot C., **Cêtre C., Cocude C., Capron A. and J. Khalife.** Immune response polarization : Role of *S. mansoni* serine proteases. British Society for Parasitology. Spring Meeting . UMIST, Manchester, UK, 8-10 April, 1997.

Cêtre C. Etude du profil cytokines dans la schistosomiase expérimentale chez le rat. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles. Belgique. 9 Janvier 1997.

CHAPITRE 3 :
STAGES ENCADRES ET
FORMATIONS DISPENSEES

3.1 Activités d'enseignement

- **Monitrice de l'enseignement supérieur du 01.11.1997 au 30.09.1998 à l'Université de Lille I.** Encadrement d'étudiants de 1ère année de Faculté de Médecine de Lille I: Animation des travaux dirigés en biologie moléculaire et en Biochimie
- **Cours de 2 heures à l'attention des étudiants du Master PARC** (Productions Animales en Régions Chaudes) en 2004 et 2005. La fièvre catarrhale ovine : virologie en entomologie, CIRAD, Campus de Baillarguet, Montpellier (34).
- **Cours de 4 heures à l'attention d'étudiants en Master PARC**, USTL, Montpellier, Février 2004, Décembre 2005 et 2006.
- **Cours de 2 heures à l'attention d'étudiants en classes préparatoires aux concours pour écoles vétérinaires et agronomie, en 2009** –Lycée Frédéric Bazille, Agropolis, Montpellier (34)

3.2 Activités d'encadrement

3.2.1 Thèse

- Aurélie PERRIN (Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II, soutenue le 23 Novembre 2007 intitulée « Contribution au développement de vaccins capripoxviraux recombinants protégeant contre la FCO »).
- Saida Emna AYARI épouse FAKHFAKH (Thèse de doctorat en cotutelle entre l'Université de Montpellier II, France et l'Université de Tunis-Carthage, Tunis, Tunisie intitulée « Développement d'un vecteur double recombinant capripoxvirus-Rift-PPR et évaluation de son immunogénicité chez l'animal » – Soutenance prévue en Décembre 2010).
- Bruno MATHIEU (Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg intitulée « Révision systématique du sous-genre *Avaritia* (Diptera : *Ceratopogonidae*) : approche morphologique et moléculaire de vecteurs potentiels du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) » Soutenance prévue en Décembre 2011.

3.2.2 Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) ou Master

- Aurélie PERRIN (DEA Parasitologie, Université Sciences et Techniques de Montpellier II)- Détection moléculaire et analyse phylogénétique de *Culicoides imicola* vecteur majeur de la Fièvre Catarrhale Ovine soutenu le 06/07/2004.
- Taoufik RAWI (Thèse de Docteur Vétérinaire, IAV Hassan II, Rabat, Maroc)-Etude expérimentale de la bluetongue chez le dromadaire soutenue le 21/07/2005.
- Bruno MATHIEU (DEA Biologie de l'Evolution et Ecologie, ENSA-USTL, Montpellier II)- Etude des Culicoides du groupe Obsoletus (Diptera :Ceratopogoniade), vecteur potentiels de la FCO :caractérisation moléculaire d'espèces et approches écologiques originales soutenu le 04/07/2005.

- Justine BOLUSSET (Master I BGAE, spécialité PARC, USTL, Montpellier II)- Quantification du génome de la bluetongue par PCR quantitative soutenu en Juillet 2005.
- Anne-Frieda TAUREL (Master I BGAE, spécialité PARC, USTL, Montpellier II)- Techniques de diagnostic de la fièvre catarrhale ovine soutenu en Juin 2006.

3.2.3 Stages Non diplômants dans le cadre de projets

- Hassiba SADAoui, vétérinaire au Laboratoire Central d'Alger, à l'INMV (Institut National de Médecine Vétérinaire), Alger, Algérie, Stage de 3 mois sur la Bluetongue- Virologie- Sérologie, Identification du virus et Isolement) dans le cadre du projet FSP-LABOVET, financé par le Ministère des Affaires Etrangères, du 06 Novembre 2006 au 28 Janvier 2007.
- Mouloud DJERBAL, vétérinaire, directeur du laboratoire de Tizi Ouzou au sein de l'INMV (Institut National de Médecine Vétérinaire, Tizi Ouzou, Algérie), Stage de 1 mois sur la Bluetongue- Entomologie (Taxonomie et Biologie Moléculaire) dans le cadre du projet FSP-LABOVET, financé par le Ministère des Affaires Etrangères, 29 Octobre au 25 Novembre 2006.
- Soufien SGHAIER, vétérinaire à l'IRVT (Institut de Recherche Vétérinaire Tunisien), Tunis, Tunisie, Stage de 1 mois sur la Bluetongue- Virologie et sérologie de la Bluetongue, Octobre 2006.

3.2.4 Participation à des comités de thèse

- Aurélie PERRIN -Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Discipline Virologie, Formation Doctorale Parasitologie, Ecole Doctorale Sciences chimiques et Biologiques pour la Santé. Contribution au développement de vaccins capripoxviraux recombinants contre la fièvre catarrhale ovine. Dates : 8 Juin 2005, 22 Juin 2006 et 22 Juin 2007.
- Bruno MATHIEU- Thèse de doctorat de l'université de Strasbourg. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé- Révision systématique du sous-genre *Avaritia* (*Diptera* : *Ceratopogonidae*) : approche morphologique et moléculaire de vecteurs potentiels du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO). Dates : 15 Juin 2009, 01 Avril 2010.
- Saida Emna AYARI épouse FAKHFAKH -Thèse de doctorat en cotutelle entre l'Université de Montpellier II, France et l'Université de Tunis-Carthage, Tunis, Tunisie- Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé CBS2- Développement d'un vecteur double recombinant capripoxvirus-Rift-PPR et évaluation de son immunogénicité chez l'animal. Dates : 30 Juin 2008, 24 Juin 2009, 16 Juin 2010.
- Elvina VIENNET -Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Ecole Doctorale SIBAGHE- Rôle vecteur des *Culicoides* dans la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine en région Paléarctique :Du contact avec l'hôte au risque de transmission. 04 Mars 2009.

CHAPITRE 4 :
BILAN DES ACTIVITES DE
RECHERCHE

Introduction

Les diverses thématiques abordées au cours de ma carrière m'ont permis de développer des sujets très variés sur différents types d'agents pathogènes, que ce soient des parasites ou des virus. La première partie de ma carrière consacrée à l'étude du parasite *Schistosoma mansoni*, puis aux coinfections *Schistosoma mansoni* et HIV-1 m'a permis d'acquérir des compétences dans l'analyse des réponses immunitaires engendrées lors d'infections simples ou de coinfections chez les rongeurs (souris, rat) et chez les populations humaines en lien avec la susceptibilité ou la résistance. En 2002, changement de cap, mes recherches s'orientent désormais vers l'étude des virus d'origine animale, aussi, j'ai choisi de me spécialiser dans les maladies d'origine virale, vectorielles et émergentes ainsi, la fièvre catarrhale ovine et la fièvre de la vallée du rift, sont devenues les maladies sur lesquelles je travaille désormais.

Les réflexions et les problèmes auxquels j'ai été confrontée dans la première partie de ma carrière me sont très utiles dans mes fonctions actuelles. L'expérience acquise en biologie moléculaire et en virologie depuis 2000 constitue une base solide pour développer de nouvelles recherches dans ce domaine. J'expose dans ce document les travaux qui me conduisent à présenter l'habilitation à diriger des recherches.

Suite à une formation pratique courte en analyses biochimiques et biologiques, j'ai choisi de me spécialiser en biologie moléculaire et cellulaire par le biais d'un Diplôme d'Université « Culture de Tissus et de Cellules », qui m'a permis de travailler pendant 3 années en biologie moléculaire dans une Start-Up, Protéine Performance située sur le station de Recherche de Pathologie Comparée INRA-CNRS de Saint Christol les Alès (30, Gard)- Mon second cycle universitaire commencé par une Maîtrise de Biochimie obtenue en Formation Continue s'est terminé par un Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Parasitologie obtenu en 1996. Mon stage de DEA, dont l'objectif était l'analyse du profil cytokines obtenu lors d'une infection par le parasite *Schistosoma mansoni* m'a permis de prendre conscience de la complexité des réponses immunologiques induites suite à une infection et d'approfondir mes connaissances en biologie moléculaire. Ce stage a aussi confirmé ma volonté de poursuivre des études et de mener une carrière dans le domaine des maladies infectieuses.

En octobre 1996, j'ai poursuivi mon cursus par une thèse portant sur l'analyse du profil des cytokines impliquées à l'infection et à la réinfection par *S. mansoni* au niveau génique et protéique avec l'analyse du profil isotypique et l'étude de l'implication de ces cytokines dans la résistance naturelle du rat à l'infection par *S. mansoni*. Ces travaux ont été réalisés dans l'Unité INSERM U.167, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur de Lille (59, Nord).

En février 2000, j'ai souhaité effectuer un séjour postdoctoral aux Etats-Unis, mon choix s'est porté sur l'étude de l'impact, en terme de profil immunitaire de la schistosomiase à *S. mansoni* dans la progression de l'infection par le HIV-1 chez des populations humaines coinfectées par ces 2 agents pathogènes, à Kisumu, au Kenya. D'autre part, l'analyse de la réponse immunitaire engendrée dans le cas de l'infection par *S. mansoni* dans un modèle murin mimant les formes intestinales modérées et les formes hépatosplénomégaliqes sévères de la pathologie a été abordée. Ces travaux ont été réalisés au CDC, Centers for Disease Control and Prevention, au National Center for Infectious Diseases (NCID), dans la Division of Parasitic Diseases (DPD), Immunology Branch à Atlanta, Géorgie, Etats-Unis et à Kisumu, au Kenya, l'une des stations de terrain du CDC.

Depuis Août 2002, je travaille au sein de l'UMR 15 /CIRAD - INRA – CMAEE (Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes) sur 2 sujets bien différents faisant appel à mes connaissances en biologie moléculaire et en virologie:

- la construction de vaccins capripoxvirus recombinants dans lesquels différents gènes d'intérêt peuvent être insérés (Fièvre catarrhale ovine, Fièvre de la vallée du Rift et Peste des Petits Ruminants).
- le développement d'outils moléculaires permettant la détection de certaines espèces de *Culicoides*, insectes vecteurs de la fièvre catarrhale ovine.

Ce chapitre 4 présente les faits marquants de mes recherches depuis ma thèse

4.1. Etude de la réponse immunitaire engendrée lors d'une infection par *Schistosoma mansoni*

Le modèle parasitaire qui a fait l'objet de mes travaux est *Schistosoma mansoni*, agent de la bilharziose intestinale. Mon travail a porté sur l'étude de la réponse immunitaire engendrée dans la schistosomiase expérimentale chez le rat, la souris puis chez les humains coinfestés par le HIV-1. La schistosomiase ou bilharziose est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Les schistosomiasis sont endémiques dans 76 pays et territoires sur les continents africain, américain et asiatique. 650 millions de personnes sont exposées au risque d'infection et 300 millions sont infectées. Les agents responsables de l'infection sont les schistosomes, vers plats hématophages, appartenant à la famille des Schistosomatidae et au genre *Schistosoma* qui rassemble 19 espèces. Parmi elles, 5 espèces sont des parasites de l'homme mais 3 d'entre elles, *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum* constituent une menace plus grave pour la santé publique du fait de leur fréquence, de l'étendue de leur distribution et de leur pathogénicité.

La compréhension des mécanismes immunologiques impliqués dans la pathologie pourrait permettre d'améliorer non seulement les stratégies déployées dans la lutte contre cette maladie mais aussi d'approfondir nos connaissances sur la réponse protectrice de l'hôte. Tandis que la souris représente le modèle expérimental de choix pour étudier la pathologie de la schistosomiase, le rat et l'homme sont les plus adaptés pour étudier les mécanismes de résistance à la réponse immune.

4.1.1. Le cas de la résistance naturelle du rat à l'infection par *S. mansoni*

Le rat est un hôte semi-permissif à l'infection et immuno-résistant à la réinfection par *S. mansoni* : les vers n'atteignent pas une maturation complète et ne produisent pas d'œufs. Le cycle évolutif de *S. mansoni* chez le rat suit un parcours identique à celui de la souris et de l'homme pendant les 3 premières semaines de l'infection (Cioli *et al.*, 1978) suivi d'un mécanisme de rejet dirigé contre les vers entre 21 et 28 jours après l'infection, plus de 75% des vers sont éliminés pendant cette période, les 25% restants entre la 4^{ème} et 10^{ème} semaine (Capron *et al.*, 1987). La réponse immune se caractérise par une hyperéosinophilie et la production d'anticorps anaphylactiques de type IgG2a et IgE impliqués dans les phénomènes d'ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) dirigés contre les schistosomules en présence de cellules phagocytaires (Capron *et al.*, 1984)- Chez le rat, des travaux ont montré que les animaux thymectomisés produisent une résistance moindre, due à une production d'anticorps de plus faible cytotoxicité mettant en évidence le rôle de la réponse T dans la résistance à l'infection et à la réinfection à *S. mansoni* (Phillips *et al.*, 1983). Par contre, la nature et le rôle des cytokines potentiellement responsables du rejet des vers d'une part et de la résistance à la réinfection d'autre part ont été abordés lors de cette thèse. Ainsi, au cours d'une infection primaire à *S. mansoni*, l'étude de l'expression des cytokines dans les poumons, les ganglions associés aux poumons et la rate permettent d'affirmer une réponse de type Th0/2

(IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13), (Cêtre *et al.*, 1998). L'influence d'une réexposition à *S. mansoni* sur la réponse Th2 polarisée à l'infection primaire ainsi que l'analyse de la réponse humorale dans l'immunité à la réinfection ont été étudiées et ont révélé l'établissement d'une réponse de type 2, avec une production d'isotypes IgE, IgG1 et IgG2a, isotypes caractéristiques d'un profil de type Th2 chez le rat et une quasi-absence d'isotypes IgG2b et IgG2c, isotypes caractéristiques d'un profil de type Th1 chez le rat (Cêtre *et al.*, 1999). Afin d'évaluer le rôle des cytokines sur l'élimination de la charge parasitaire, l'administration d'anticorps anti-cytokines a permis de mettre en évidence, que seule, la co-administration d'IgG anti-IL-4 et anti-IL-13 diminuait de façon significative la réponse IgE totale (Cêtre *et al.*, 2000a) et que l'administration d'anticorps anti-récepteurs IL-4 et IL-13 à des rats primo infectés provoquent une augmentation significative de la charge parasitaire (Cêtre *et al.*, 2000b) confirmant le rôle des cytokines IL-4 et IL-13 dans l'élimination de la charge parasitaire.

Publications principales relatives au sujet

Cêtre C., Cocude C., Pierrot C., Godin C., Capron, A., M. Capron and J. Khalife. *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. **1998**. 20:135-142.

Khalife J., Pierrot C., Cocude C., **Cêtre C.**, Godin C. and A. Capron. Molecular cloning and sequencing of the rat interleukin-12p40 gene. *European Cytokine Network*. **1998**. 9: 69-73.

Pierrot C., Cocude C., **Cêtre C.**, Godin C., Lafitte S. and J. Khalife. Expression of rat interleukin-5 and generation of neutralizing antiserum : comparative study of rat IL-5 produced in *E. coli* and insect cells. *Biological and Biochemical Research Communications*. **1998**. 253: 756-760.

Cêtre C., Pierrot C., Cocude C., Lafitte S., Capron A, Capron M. and J. Khalife. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. *Infection and Immunity*. 1999. **67**: 2713-2719.

Cêtre C., Pierrot C., Maire E., Lafitte S., Capron A, Capron M. and J. Khalife. Interleukin-13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *European Cytokine Network*. **2000a**. 11 :241-250.

Khalife J., **Cêtre C.**, Pierrot C. and M. Capron. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. *Parasitology international*. **2000b**. 49:339-345.

Pierrot C, Khalife J, **Cêtre C**, Capron A, Capron M. Contribution of experimental models to the understanding of immunity to schistosomiasis. *C R Acad Sci III*. **2001**. 324 :1133-40.

Publications secondaires

Cocude C., Pierrot C., **Cêtre C.**, Godin, C., Capron A. and J. Khalife. Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology*. **1997**. 115: 395-402.

Petitprez K., Khalife J., **Cêtre C.**, Lafitte S., Fontaine J., Capron A. and J.M. Grzych. Cytokine mRNA expression involved in the induction of a mucosal IgA response in the rat. *Scandinavian Journal of Immunology*. **1999**. 49: 14-20.

Cocude C., Pierrot C., **Cêtre C.**, Fontaine J., Godin A. and J. Khalife. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I. *Parasitology*. **1999**. 118: 389-396.

4.1.2. Le cas d'un modèle murin mimant les formes intestinales modérées et les formes hépatosplénomégaliqes sévères de la pathologie.

Un modèle murin (souris CBA/J) mimant les formes intestinales modérées MSS (Moderate Splenomegaly Syndrome) et les formes hépatosplénomégaliqes sévères HSS (HyperSplenomegaly Syndrome) de la pathologie induite par *S. mansoni* après 20 semaines d'infection a été étudié. Six semaines après infection, les souris qui sont en devenir de profil MSS produisent des anticorps idiotypes de type CRI (cross-reactive idiotypes) alors que les souris en devenir de profil HSS ne produisent pas ces CRI. La présence de ces idiotypes est donc d'un intérêt certain pour prédire le degré de sévérité de la pathologie, elle a été utilisée comme base pour évaluer les autres éventuels évènements précoces associés. Huit semaines après infection, une corrélation négative a été observée entre le niveau de CRI et la splénomégalie, le nombre d'oeufs et le taux d'hydroxyproline dans le foie. Chez la souris infectée par *S. mansoni*, une réponse immunitaire de type Th1 est induite avant la ponte des œufs suivie d'une réponse de type Th2 après la ponte (Pearce *et al.*, 1991, Grzych *et al.*, 1991, Yamashita *et al.*, 1992). Dans notre cas, l'expression des cytokines IL-4, IL-5 et GM-CSF induites suite à la stimulation par le phorbol myristate acetate (PMA)- et ionomycine des TCD4⁺ spléniques est inversement corrélée avec le niveau de CRI et directement corrélée avec la taille de la rate. Au contraire, la production de TNF- α intracellulaire et la production d'oxyde nitrique par les cellules péritonéales sont en corrélation positive avec la présence de CRI et inversement corrélées avec la morbidité. La production d'IL-10 et d'IFN- γ n'est pas corrélée avec la présence de CRI. Les résultats avancés dans cette étude permettent de lier précocement les degrés de sévérité de la pathologie à un type de réponse immunologique (secrétion des cytokines IL-4, IL-5 et GM-CSF) pendant la phase aigüe de la schistosomiase.

Cêtre-Sossah C., Montesano A, Freeman, G.L. Jr, Wilard MT, Colley, D.G. and W.E. Secor. Early responses associated with chronic pathology in murine schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **2007**, 29(5):241-9

4.1.3. Le cas des populations humaines coinfectées par *S. mansoni* et le HIV-1 : impact de la schistosomiase sur la progression de l'infection par le HIV-1

Des études préliminaires ont mis en évidence que la présence de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) présentaient un environnement favorable dans la progression de l'infection HIV (Clerici *et al.*, 1994 ; Maggi *et al.*, 1994). Par ailleurs, les schistosomiasés prédisposent leurs hôtes à un profil immunitaire de type 2 avec augmentation d'IL-5 corrélée à une acquisition à la résistance avec la présence de mécanismes d'ADCC en présence de cellules effectrices (macrophages, plaquettes, éosinophiles). Ainsi une infection chronique par *S. mansoni* et l'activation immunitaire causée par celle-ci peuvent favoriser une évolution d'une infection HIV vers le développement de signes cliniques spécifiques du SIDA de façon plus rapide.

Une étude chez une cohorte de personnes couramment exposées à *S. mansoni* a montré que certaines d'entre elles avaient développé une résistance à la réinfection par *S. mansoni* alors que d'autres restaient sensibles. Il a été montré que des pourcentages élevés d'éosinophiles circulants sont associés à la résistance à la réinfection par *S. mansoni* chez des personnes séronégatives pour le HIV-1 alors que chez les personnes HIV1+, le faible nombre de lymphocytes T CD4⁺ est associé à un faible taux d'éosinophiles sanguins. De plus, l'expression du récepteur aux IgE, Fc ϵ RI (chaîne β) est corrélée avec le niveau d'IgE totaux et IgE spécifiques présents dans les sérums des personnes HIV-, ce qui n'est pas le cas pour les personnes HIV+ (Ganley-Leal *et al.*, 2006a). Les éosinophiles semblent donc avoir un

rôle dans le développement de l'immunité protectrice contre les schistosomes et les modifications observées chez les personnes séropositives pour le HIV-1 provoquent une plus grande sensibilité à la réinfection.

Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, **Cêtre-Sossah CB**, Andove J, Hightower AW, Karanja DM, Colley DG, Secor WE. Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans. *Infect Immun*. **2006a**. 74(4):2169-76.

Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, **Cêtre-Sossah CB**, Andove J, Hightower AW, Karanja DM, Colley DG, Secor WE. Higher percentages of circulating mast cell precursors correlate with susceptibility to reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. **2006b**. 75(6):1053-7.

Les collaborations entre mon laboratoire d'accueil (Département Parasitologie) et le département d'épidémiologie du CDC m'ont permis d'effectuer des travaux relatifs à *Leishmania donovani*, au Bangladesh, avec notamment la mise au point d'un test ELISA basé sur la protéine K-39 permettant de mettre en évidence non seulement les cas aigus de Kala-Azar, mais également et surtout les cas asymptomatiques.

Bern C, Hightower AW, Chowdhury R, Ali M, Amann J, Wagatsuma Y, Haque R, Kurkjian K, Vaz LE, Begum M, Akter T, **Cêtre-Sossah CB**, Ahluwalia IB, Dotson E, Secor WE, Breiman RF, Maguire JH. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg Infect Dis*. **2005** (5):655-62.

Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, **Cêtre-Sossah C**, Akhter S, Roy S, Steurer F, Amann J, Ali M, Chowdhury R, Wagatsuma Y, Williamson J, Crawford S, Breiman RF, Maguire JH, Bern C, Secor WE. Application of an improved method for the recombinant K 39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diagn Lab Immunol*. **2005** (12):1410-5.

Ces différents travaux sur *S. mansoni* et HIV-1 ont permis de montrer que des pourcentages élevés d'éosinophiles circulants sont associés à la résistance à la réinfection par *S. mansoni* chez des personnes séronégatives pour le HIV-1 alors que chez les personnes HIV1+, le faible nombre de lymphocytes T CD4+ est associé à un faible taux d'éosinophiles sanguins. De plus, l'expression du récepteur aux IgE, FcepsilonRI (chaîne bêta) est corrélée avec le niveau d'IgE totaux et IgE spécifiques présents dans les sérums des personnes HIV-, ce qui n'est pas le cas pour les personnes HIV+. Les éosinophiles semblent donc avoir un rôle dans le développement de l'immunité protectrice contre les schistosomes et les modifications observées chez les personnes séropositives pour le HIV-1 provoquent une plus grande sensibilité à la réinfection. Ces résultats sont en faveur d'une meilleure compréhension des réponses immunitaires engendrées chez des patients co-infectés et soumis à une réinfection permanente par *S. mansoni*.

J'ai pu acquérir au cours de cette première expérience dans le milieu infectieux des connaissances tant au niveau biologie moléculaire, virologie qu'immunologie qui me permettent d'affronter désormais mes nouvelles activités de recherche liées aux maladies animales virales émergentes et à leurs vecteurs. Mon passé dans le monde des parasites n'a pas été un frein bien au contraire lorsque l'opportunité de travailler sur les maladies virales touchant les pays du Sud s'est présentée. Il va sans dire que le lien entre ces maladies parasitaires et virales est leurs localisations dans les pays du Sud et plus particulièrement les

zones tropicales. Le fait qu'un grand nombre de maladies virales émergentes sont transmises par des vecteurs (WNV (West Nile Fever), CCHF (Crimea-Congo Hemorrhagic Fever), RVF (Rift Valley Fever)) est un point commun avec bon nombre de parasitoses.

Les travaux qui sont présentés dans le sous-chapitre suivant ont attiré à la fièvre catarrhale ovine, qui sévit depuis de nombreuses années en Afrique et en Amérique du Nord et qui a émergé en Corse en 2000 et en France continentale en 2006. Après une brève bibliographie de la maladie, les objectifs de mon travail seront présentés en 2 parties distinctes.

4.2 Les culicoides et la fièvre catarrhale ovine

4.2.1 Historique et répartition

La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou Bluetongue (BT) est une maladie virale, infectieuse, non contagieuse, transmissible, à déclaration obligatoire et qui affecte les ruminants domestiques ou sauvages. La FCO est observée pour la première fois en 1880, en Afrique du Sud, sur un troupeau importé de moutons de race mérinos (Hutcheon, 1881). C'est également Hutcheon, en 1902, qui fait la première description de la maladie sous le nom de *Malarial catarrhal fever of sheep* (Erasmus, 1985; Hutcheon, 1902; Verwoerd & Erasmus, 1994), puis Spreull, de manière plus détaillée, en 1905 sous le nom de bluetongue (Spreull, 1902; 1905). L'origine virale de la maladie ainsi que les espèces sensibles ont été définies dès 1905 par Theiler (Howell, 1960; 1970; Theiler, 1906) et le virus a été isolé pour la première fois en Australie en 1975. En 1948, Neitz met en évidence l'existence de plusieurs sérotypes viraux au travers d'études de protections croisées chez le mouton (Neitz, 1948). L'implication du rôle vecteur de *Culicoides imicola* connu également sous la dénomination de *C. pallidipennis* est établie en 1944 par Du Toit (Du Toit, 1944); depuis, la capacité de transmission du virus de la FCO a été démontrée pour de nombreuses autres espèces de *Culicoides*.

La maladie s'est limitée au continent africain jusque dans les années 1940 puis s'est étendue à partir de 1943 dans le bassin méditerranéen (Chypre, Israël, Turquie, Syrie, Oman, Arabie Saoudite), et l'Asie (Inde, Chine, Pakistan, Japon, Indonésie, Malaisie) (Verwoerd & Erasmus, 1994). On la retrouve également de manière endémique en Amérique du Nord (USA, Canada), Amérique Centrale, Amérique du Sud (Mexique, Chili, Brésil, Guyane), Australie et Nouvelle-Zélande dès les années 1950. Dans la littérature, la FCO est traditionnellement décrite comme une maladie présente sur tous les continents dans une zone géographique comprise entre des latitudes de 40°- 50° Nord et 20°-30° Sud (Lefèvre, 2003). En revanche, les sérotypes ne sont pas représentés de manière uniforme sur tous les continents. Plus récemment, en 1998, cette maladie est réapparue en Grèce, puis en 1999 en Bulgarie, Tunisie et Turquie ; en 2000 en Tunisie, Algérie, Italie (Sardaigne, Sicile et Calabres), Espagne (îles Baléares), et en France (Corse) (Zientara *et al.*, 2000; 2002, Mellor *et al.*, 2008). La propagation de la maladie en Europe a suivi deux voies : une première introduction du virus par l'Asie (sérotypes 9, 16) et une seconde par le Maghreb (sérotypes 1, 2, 4). La maladie s'est également étendue vers le Nord et a sévi en Bulgarie, au Kosovo et en Serbie (Purse *et al.*, 2005). En août 2006, plusieurs dizaines de foyers ont été diagnostiqués pour la première fois dans le Nord de l'Europe, Allemagne, Belgique, Hollande et France (OIE, 2006). Le sérotype incriminé est le sérotype 8 (Toussaint *et al.*, 2007). Une des caractéristiques de cette épizootie est la pathologie sévère observée chez les bovins (Thiry *et al.*, 2006). L'origine de l'infection par ce nouveau sérotype, jusqu'alors inexistant dans le bassin méditerranéen, est inconnue. De plus, une espèce de *Culicoides* locale décrite comme vecteur potentiel semble avoir pris le relais du vecteur avéré dans le bassin méditerranéen, *C. imicola*, absent dans cette zone. Ainsi *C. chiopterus* a été identifié comme vecteur majeur de la maladie au cours de cette épizootie (Dijkstra *et al.*, 2008).

La figure 1 fait un état des lieux de la répartition géographique actuelle de la maladie dans le monde entier. Les raisons des changements dans l'épidémiologie de la FCO sont complexes et sont liées à différents facteurs notamment à de récentes extensions de la distribution de son vecteur majeur, *C. imicola*, mais aussi à l'implication de nouveaux insectes vecteurs du genre *Culicoides* pouvant jouer alors le rôle de relais. Les variations climatiques et notamment de températures peuvent jouer un rôle à la fois dans l'augmentation de la compétence vectorielle dans les populations de *Culicoides* (Mullens *et al.*, 1995; Wittmann *et al.*, 2002) mais également dans la capacité de transmission chez des espèces habituellement réfractaires à l'infection (Mellor, 2000b).

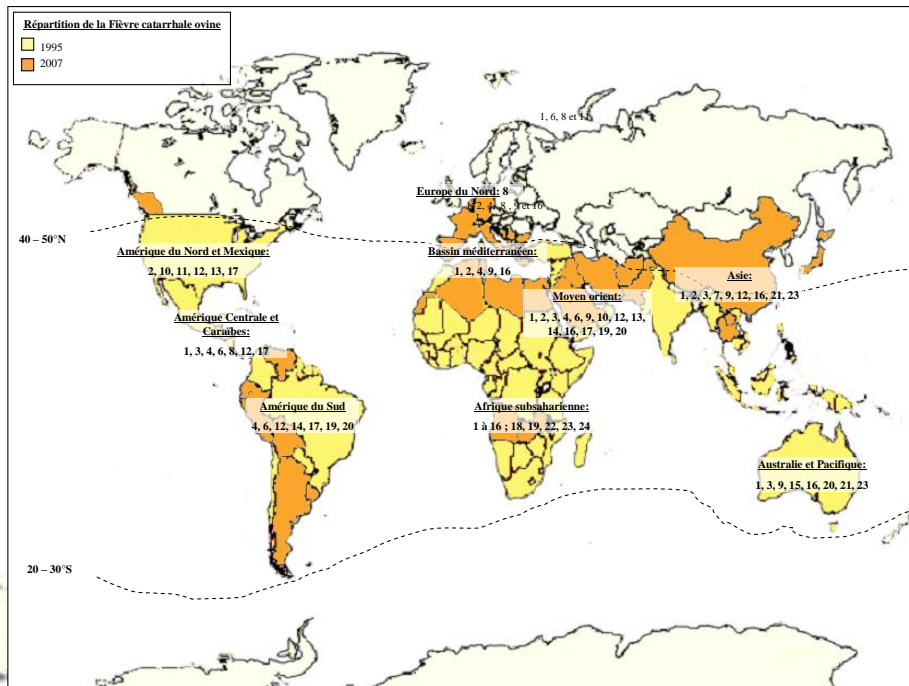


Figure 2 - Carte de répartition de la fièvre catarrhale ovine en 2009

Adapté de Barber, 1979; Clavijo *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 1995; Dulac *et al.*, 1989; 1992; Gibbs & Greiner, 1988, 1994; Lefèvre, 2003; Sharifah *et al.*, 1995. Les sérotypes incriminés sont précisés pour chacune des zones géographiques.

4.2.2 Le vecteur

La FCO est transmise essentiellement par des insectes hématophages appartenant au genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Latreille 1809. La famille des *Ceratopogonidae* comprend environ 5500 espèces réparties en 125 genres dont le genre *Culicoides* (Mellor *et al.*, 2000a). Ce dernier compte, à lui seul, plus de 1254 espèces (Beckenbach & Borkent, 2003) réparties en 25 sous-genres dont le genre *Avaritia* Fox, 1955 comprenant plusieurs espèces impliquées dans la transmission de la FCO. Seulement une dizaine d'espèces de *Culicoides* ont été incriminées dans la transmission du virus de la FCO (Tableau 1) (Mellor, 1990; Meiswinkel, 2004). Ces insectes sont également impliqués dans la transmission de nombreuses maladies, humaines ou vétérinaires. Ainsi, ils sont responsables de la transmission de nématodes, de protozoaires (Linley, 1985) et de nombreux virus de la famille des *Bunyaviridae* (virus Akabane), *Rhabdoviridae* et *Reoviridae* (virus de la peste équine africaine (AHSV) et de la maladie hémorragique du daim (EHDV).

La diffusion de ces insectes se fait beaucoup par transport passif, notamment par le vent (Sellers, 1980). Ainsi des vols jusqu'à 700 Kms seraient possibles (Mellor *et al.*, 2000b). De nombreuses études ont montré que l'introduction de nouvelles maladies était très fortement liée

à des mouvements passifs de *Culicoides* (Homan *et al.*, 1990; Mohammed & Taylor, 1987; Sellers *et al.*, 1979; Sellers & Maarouf, 1989). La capacité de transmission d'agents pathogènes, notamment du virus de la FCO, n'a été établie de manière définitive que pour quelques espèces de *Culicoides* et est suspectée pour d'autres espèces (Delécolle & Schaffner, 2003). Celle-ci est conditionnée par le vecteur lui-même, le virus, l'hôte et les conditions climatiques (Hardy *et al.*, 1983). La capacité vectorielle des *Culicoides* dépend également de facteurs environnementaux dont la température principalement (Mullens *et al.*, 1995). En effet, les basses températures diminuent le taux d'infection, la virogenèse, la fréquence des repas, et repoussent la date de la première piqûre infectante. A l'inverse, des températures élevées augmentent ces mêmes phénomènes et accélèrent les processus de réplication virale à l'intérieur de l'insecte (Gerry & Mullens, 2000).

De plus, il a été suggéré que des températures élevées pourraient augmenter la capacité vectorielle d'espèces qui ne sont habituellement pas considérées comme vectrices (Wittmann, 1999). L'identification des espèces et la systématique en général, sont réalisées en fonction de ressemblances morphologiques sur la base d'une clé d'identification (Delécolle, 1985) et notamment grâce aux motifs alaires composés de zones claires et de zones sombres (Figure 2). Lorsque le patron alaire ne permet pas une identification précise de l'espèce, les spécimens doivent être disséqués et montés sur lames pour être identifiés microscopiquement. L'identification des femelles est basée sur la forme des spermathèques, l'espace inter oculaire, le nombre et l'arrangement des soies présentes sur les antennes. Pour les mâles, la forme du genitalia est généralement suffisante pour établir une identification spécifique (Meiswinkel *et al.*, 1994). Les larves des différentes espèces de *Culicoides* sont difficilement identifiables sur le plan morphologique.

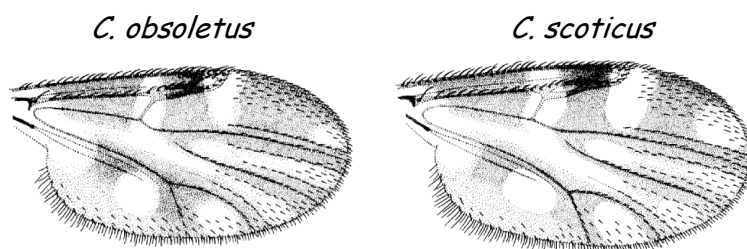
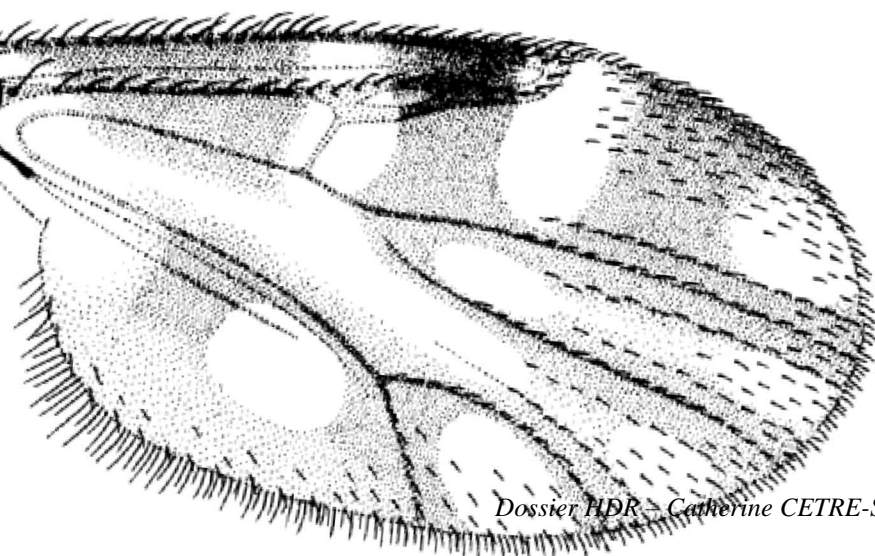


Figure 2 - Patron alaires de *Culicoides obsoletus* et *Culicoides scoticus*

D'après Jean-Claude Delécolle, communication personnelle.



Objectifs du travail de biologie moléculaire élaboré sur les vecteurs de la fièvre catarrhale ovine:

En 2006, 2007 (sérotypage 8) et 2008 (sérotypes 8 et 1), des épizooties majeures de FCO en absence du vecteur *C. imicola*, vecteur avéré de la FCO jusqu'ici dans le bassin méditerranéen touchent une grande partie du Nord de l'Europe (France, Angleterre, Belgique, Allemagne, Pays-Bas, Danemark, Suisse, République tchèque). Des isolements viraux conduisent à soupçonner le rôle vecteur d'espèces locales appartenant notamment au sous-genre *Avaritia*. Ainsi, certaines espèces de ce sous-genre sont reconnues aujourd'hui comme fortement impliquées dans la transmission de la FCO. Les taxonomistes s'accordent pour rassembler certaines de ces espèces au sein de groupes. Ces groupes/ensembles présentent de telles similitudes morphologiques entre les espèces qu'il est parfois délicat d'identifier un spécimen. L'identification de chacune de ces espèces de *Culicoides* se fait par morphologie sur la base d'une clef d'identification et nécessite par conséquent une expertise certaine en taxonomie. Dès lors que parmi ces espèces se trouvent un voire plusieurs vecteurs de la FCO, une révision systématique et moléculaire est clairement nécessaire pour clarifier les espèces du sous-genre *Avaritia* dont *C. obsoletus* ou *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus*. Bien que ces espèces aient une morphologie bien typique, il n'en demeure pas moins que les femelles de *C. obsoletus* et *C. scoticus* ont une morphologie tellement proche que la discrimination n'est pas toujours évidente (espèces regroupées sous le terme de *C. obsoletus/scoticus*).

Un certain nombre d'outils d'identification moléculaire ont été récemment développés à partir de différents marqueurs soit mitochondriaux : cytochrome oxydase I (Dallas *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2002, Nolan *et al.*, 2007, Pagès *et al.*, 2005), cytochrome oxydase II (Beckenbach & Borkent, 2003), soit ribosomaux : ITS-2 (Gomulski *et al.*, 2006) ou ITS-1 (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006, Mathieu *et al.*, 2007). Nous nous sommes intéressés à développer les marqueurs ITS-1 qui représentent avec tous les autres une aide précieuse à la taxonomie classique et permettront non seulement de mieux définir le biotope larvaire de certaines espèces encore bien mal connu, de quantifier les adultes présents dans les pièges de capture sur le terrain dans le cadre de réseaux d'épidémiosurveillance nationaux mais également de revisiter les groupes ou ensemble d'espèces en comparant les données morphologiques et moléculaires. Il va sans dire, que la mise en place des techniques de biologie moléculaire s'est faite en totale harmonie avec les taxonomistes qui ont identifié tous les spécimens utilisés et sans qui rien n'aurait pu être initié.

Ces objectifs sont détaillés en 2 points dans ce manuscrit :

- Un premier point a consisté au séquençage de 36 espèces présentes sur le littoral méditerranéen français ce qui a permis de dresser des arbres phylogénétiques et d'évaluer non seulement la variation des séquences entre les espèces mais également de situer l'espèce vectrice *C. imicola*, espèce vectrice dans le bassin méditerranéen jusqu'en 2006 parmi les autres espèces de *Culicoides* (Paragraphe 4.2.3).
- Un second point consiste au développement de tests de diagnostic quantitatif ou qualitatif par PCR basés sur les marqueurs ITS-1. Cet outil va permettre d'identifier différentes espèces de *Culicoides* d'intérêt par biologie moléculaire permettant aussi la caractérisation du biotope larvaire pour de nombreuses espèces pour lequel il n'est pas connu. La distinction morphologique des larves de *Culicoides* est difficile voire impossible, alors qu'une identification moléculaire par PCR est tout à fait réalisable.

Espèces	Localisations géographiques
<i>C. imicola</i>	Afrique ^{1, 2, 3, 4, 5} , Bassin méditerranéen ^{6, 7, 8} , Asie ^{9, 10, 11, 12}
<i>C. brevitarsis</i>	Asie ¹³ , Australie ¹⁴
<i>C. bolitinos</i>	Afrique du Sud ^{15, 16}
<i>C. obsoletus</i>	Bassin méditerranéen ^{17, 18}
<i>C. scoticus</i>	Bassin méditerranéen ¹⁹
<i>C. dewulfi</i>	Europe du Nord ²⁰
<i>C. fulvus</i>	Australie ¹⁴ , Asie ^{13, 21, 22}
<i>C. dumdumi</i>	Asie, Australie ²³
<i>C. orientalis</i>	Asie ^{13, 21, 22}
<i>C. actoni</i>	Australie, Asie ²⁴
<i>C. pusillus</i>	Amérique centrale ^{25, 26} , Amérique du Sud ²⁵
<i>C. wadai</i>	Asie ^{13, 21} , Australie ²⁷
<i>C. brevipalpis</i>	Asie ²⁸ , Australie ²⁸
<i>C. gulbenkiani</i>	Afrique du Sud ²³
<i>C. tororoensis</i>	Afrique ³
<i>C. pulicaris</i>	Europe ²⁹
<i>C. magnus</i>	Afrique ²³
<i>C. sonorensis</i>	Amérique Centrale ³² , Amérique du Nord ^{30, 31} , Amérique du Sud ³²
<i>C. nubeculosus</i>	Europe de l'Est ³³
<i>C. puncticolis</i>	Afrique ²³
<i>C. oxystoma</i>	Chine ²⁸
<i>C. nevillei</i>	Afrique ²³
<i>C. insignis</i>	Amérique du Sud ^{25, 34} , Amérique centrale ²⁶ , Caraïbes ^{25, 26}
<i>C. filarifer</i>	Amérique Centrale ²⁶ , Australie ¹⁴
<i>C. peregrinus</i>	Afrique ²³
<i>C. milnei</i>	Amérique du Nord ^{3, 35}
<i>C. stellifer</i>	Amérique du Nord ³⁶
<i>C. furens</i>	Afrique ³⁷
<i>C. pycnostictus</i>	Amérique du Nord ³⁸
<i>C. trilineatus</i>	Amérique Centrale ³⁸
<i>C. homotomus</i>	Asie ²⁸
<i>C. cornutus</i>	Afrique ³⁹
<i>C. boydi</i>	Amérique du Nord ²⁸

Tableau 1 - Liste des 33 espèces du genre *Culicoides* impliquées dans la transmission de la FCO

Adapté de ¹Meiswinkel *et al.*, 1994; ²Blackburn *et al.*, 1985; ³Walker & Davies, 1971; ⁴Mellor *et al.*, 1984; ⁵Nevill *et al.*, 1992; ⁶Mellor *et al.*, 1985; ⁷Mellor *et al.*, 1990; ⁸Boorman, 1986; ⁹Boorman, 1989; ¹⁰Braverman *et al.*, 1976; ¹¹Jennings *et al.*, 1983; ¹²Muller & Li, 1996; ¹³Sukarsih *et al.*, 1993; ¹⁴Standfast *et al.*, 1985; ¹⁵Venter *et al.*, 1998; ¹⁶Venter & Meiswinkel, 1994; ¹⁷Mellor & Pitzolis, 1979; ¹⁸De Liberato *et al.*, 2005; ¹⁹Savini *et al.*, 2005; ²⁰OIE, 2006; ²¹Sukarsih *et al.*, 1996; ²²Sendow *et al.*, 1996; ²³Meiswinkel *et al.*, 2004; ²⁴Zhang *et al.*, 1999; ²⁵Greiner *et al.*, 1985; ²⁶Mo *et al.*, 1994; ²⁷Mellor, 1998; ²⁸FAO; ²⁹Caracappa *et al.*, 2003; ³⁰Tabachnick, 1992; ³¹Tabachnick & Holbrook, 1992; ³²Mellor *et al.*, 2000a; ³³Mellor & Leake, 2000b; ³⁴Kramer *et al.*, 1985; ³⁵Wieser-Schimpf *et al.*, 1993; ³⁶Mullen & Anderson, 1998; ³⁷Paweska *et al.*, 2002; ³⁸Greiner *et al.*, 1990; ³⁹Venter *et al.*, 1994

4.2.3 Analyse phylogénétique des *Culicoides* basé sur le marqueur moléculaire ITS-1

Des premiers travaux faisant l'objet du DEA d'Aurélié Perrin que j'ai encadré en 2004 ont consisté au séquençage et en l'analyse phylogénétique de différentes espèces de *Culicoides* présentes sur le littoral méditerranéen (notamment *Culicoides imicola*), analyse basée sur les séquences des marqueurs ribosomaux ITS-1 (Figure 3). Cette analyse a permis de situer l'espèce *C. imicola* parmi différentes espèces de *Culicoides* en lien avec leurs préférences écologiques.

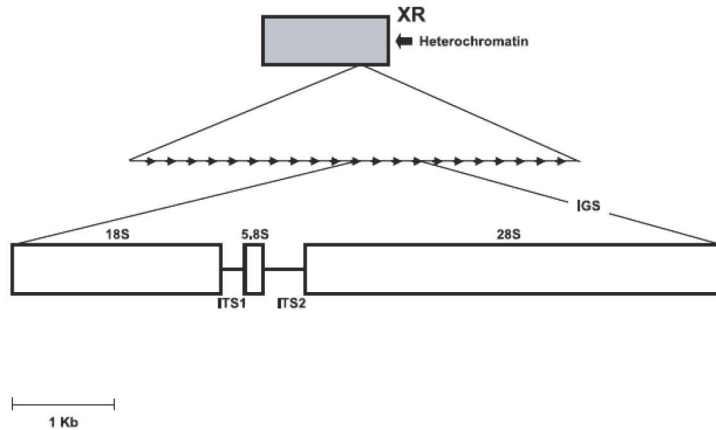


Figure 3 : Localisation des ITS-1 sur l'ADN ribosomal. Adapté de Gentile *et al.*, 2002.

La Figure 4 (Perrin *et al.*, 2004) présente les 8 différents groupes (clades) obtenus, chacun d'entre eux étant plus ou moins, en lien avec un biotope particulier.

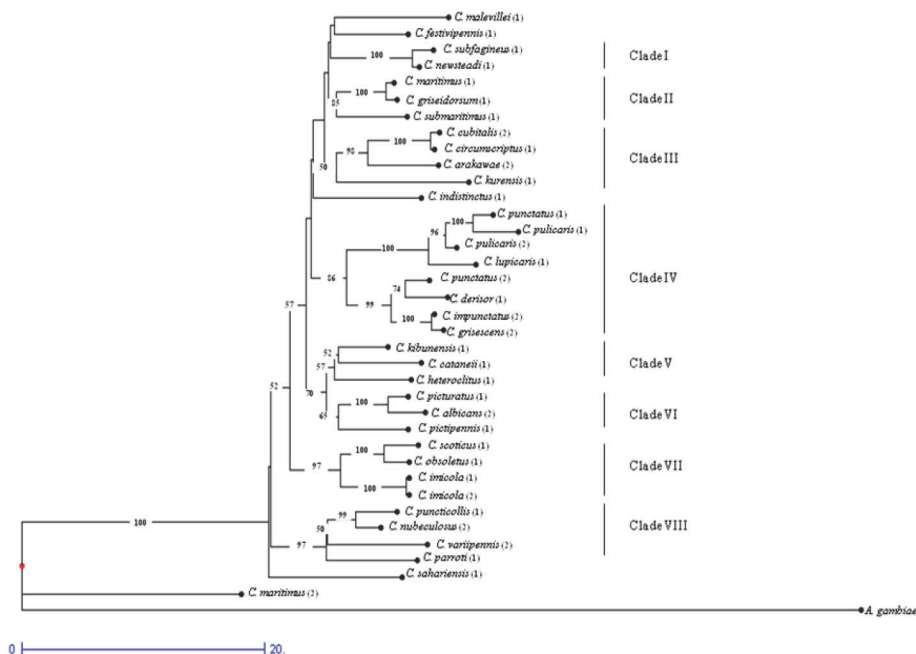


Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les ITS-1 – Fig. 1 de Perrin *et al.*, 2004

Parmi ces 8 clades, le clade I comporte *C. subfagineus* et *C. newsteadi*, espèces appartenant toutes 2 au même sous-genre *Culicoides* avec les espèces du Clade IV, mais avec un biotope larvaire différent, moisissures de bois et milieu salin respectivement. Le clade II regroupant les espèces *C. maritimus*, *C. griseidorsum*, et *C. submaritimus*, forme un premier groupe écologique d'espèces halophiles (Kremer *et al.*, 1965) et le troisième clade comporte 4 espèces : *C. cubitalis*, *C. circumscriptus*, *C. arakawai*, *C. kurensis* correspondant à des espèces avec des biotopes différents d'une espèce à l'autre. Le clade IV regroupe *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. punctatus*, *C. impunctatus*, *C. grisescens* et *C. derisor*, espèces appartenant toutes au sous-genre *Culicoides* excepté *C. derisor* avec un biotope commun de milieux pauvres en substances organiques et d'altitude. Les espèces des groupes V et VI correspondent à un même biotope de substrats non salés. Le clade VII regroupe l'espèce d'intérêt, compétente vectoriellement au Sud de l'Europe *C. imicola*, ainsi que *C. obsoletus*, et *C. scoticus*, 2 espèces suspectées vectrices de la FCO, ces 3 espèces appartiennent au sous-genre *Avaritia* regroupant d'autres vecteurs de la FCO hors Europe : *C. bolitinos* (Afrique), *C. fulvus*, *C. actoni*, *C. wadai* (Asie), *C. wadai* et *C. brevitarsis* (Australie) avec un biotope mal défini, un milieu riche en matières organiques et de type milieu d'élevage (boues, fumiers). Le clade VIII, composé des espèces *C. parroti*, *C. puncticollis*, appartenant au sous-genre *Monoculicoides*, correspondant à des espèces vivant en milieux vaseux riches en matières organiques.

Conclusion : Les résultats de l'analyse phylogénétique obtenus à partir des séquences ITS-1 sont en concordance avec la taxonomie faite à partir de la morphologie. Cette étude a permis de mettre en évidence l'intérêt des ITS-1 comme marqueurs moléculaires permettant de réaliser des analyses phylogénétiques et de distinguer les différentes espèces de *Culicoides*. Il faut bien évidemment garder à l'esprit que l'utilisation de différents marqueurs nucléaires et mitochondriaux est très importante pour typer différentes populations qui peuvent varier au niveau de leurs séquences, d'une région géographique à une autre et à plus grande échelle d'un pays à un autre.

4.2.4 Développement de tests moléculaires permettant la détection de l'espèce *Culicoides imicola*, vecteur confirmé de la fièvre catarrhale ovine (FCO) en Corse et des espèces du groupe *Obsoletus* vectrices de la FCO sur le continent Français

*4.2.4.1 Détection de *C. imicola**

Je me suis intéressée d'abord au développement d'une technique PCR basée sur les marqueurs ITS-1 (Internal Transcribed Spacer), de l'ADN ribosomal permettant la détection du vecteur d'intérêt en 2004 *Culicoides imicola*, vecteur pouvant être présent dans les pièges, et être la source d'une introduction de FCO en Europe par la voie Sud-Est (Corse vers la vallée de l'Argens (83)). Ce vecteur est en effet présent en Corse depuis 2000 ainsi que sur la côte Sud-Est méditerranéenne Française (Roquebrune sur Argens (83) depuis 2003. Pour cela, j'ai mis au point une PCR conventionnelle à partir de différentes espèces de *Culicoides*. Le choix des amorces s'est fait à partir de l'alignement de 11 séquences d'ITS-1 d'espèces connues de *Culicoides*. Les résultats obtenus présentent une très bonne spécificité, avec l'amplification d'un fragment de 303 bp spécifique de *C. imicola* (Figure 5) (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004).

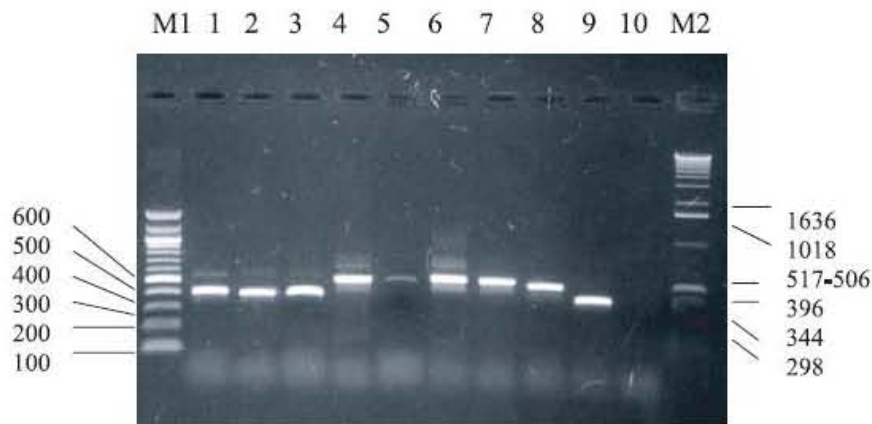


Figure 3s Genus amplification of the 9 *Culicoides* species ITS1 by PCR (PanCulF/PanCulR). M1 represents 100 bp DNA ladder, M2 marker X (Roche, USA). Lanes 1 to 10 correspond respectively to *C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus*, *C. imicola*, Negative Control.

Cette première PCR conventionnelle qualitative permettant la détection de *C. imicola* de façon spécifique m'a permis de développer une PCR en temps réel permettant la quantification de spécimens de *C. imicola* présents dans un piège dans le cadre du réseau de surveillance entomologique français (Cêtre-Sossah *et al.*, 2008). Ainsi, des courbes standard ont été établies avec un très bon coefficient de corrélation de $r^2=0.99$ à partir de plasmides contenant les ITS-1 de *C. imicola*. Un total de 100 pièges répartis sur le littoral méditerranéen ont été testés négatifs pour la présence de *C. imicola*. Sur 40 de ces pièges choisis au hasard en double aveugle, soit 1 spécimen de *C. imicola* (dans les 20 pièges) soit 5 spécimens (dans les 20 autres pièges) ont été ajoutés. Sur chacun de ces 100 pièges, la PCR a été réalisée, et un certain nombre de valeurs de Ct ont été obtenues et sont présentées Figure 6. Il apparaît qu'en fixant un seuil de Ct de valeur de 30.5, la sensibilité de notre technique est de 95% et la spécificité de 92% (Figure 7).

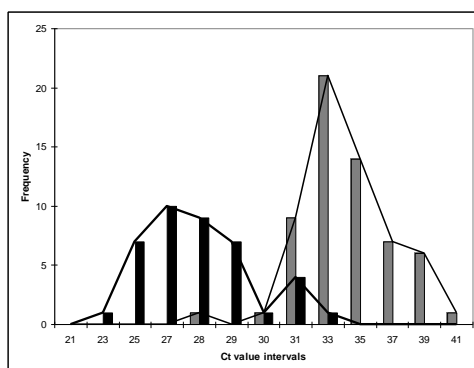


Figure 6 : Distribution des valeurs de Ct obtenues à partir de 100 pièges à UVs en France continentale en 2004 (pays indemne).

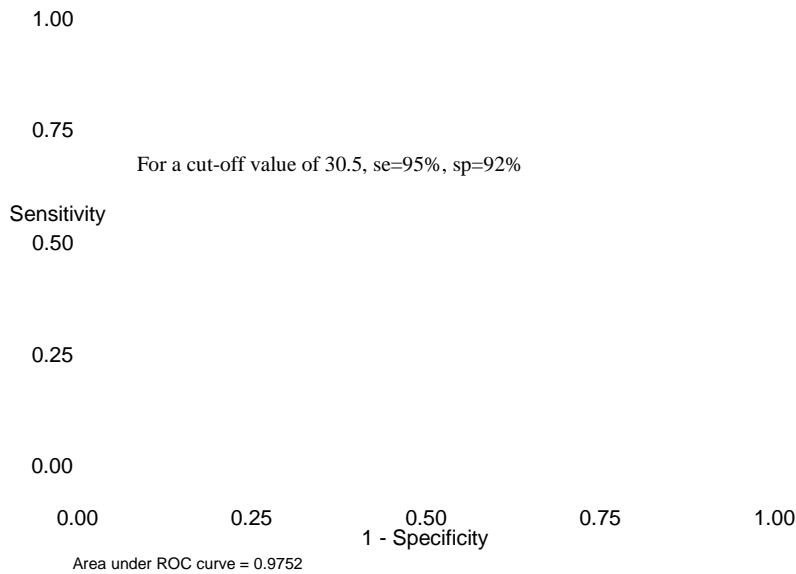


Figure 7 : Courbe ROC obtenue avec les valeurs de Ct de PCR temps réel et la morphologie (considéré comme gold standard).

Conclusion : Cette technique de PCR temps réel est donc d'une grande utilité dans les réseaux d'entomosurveillance européens et demande à être étendue à d'autres espèces de *Culicoides* compétents et présents en Europe du Nord (espèces du groupe *Obsoletus*) puisque robuste et avec une très bonne sensibilité et spécificité.

4.2.4.2 Détection des espèces du groupe *Obsoletus*

Comme il a déjà été décrit précédemment, l'identification est réalisée en fonction de ressemblances morphologiques sur la base d'une clé d'identification (Delécolle, 1985) et notamment grâce aux motifs alaires composés de zones claires et de zones sombres. Cependant, un certain nombre d'espèces notamment les 5 espèces composant le groupe *Obsoletus* : *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, *C. scoticus* sont difficilement différenciables. La mise au point d'une PCR multiplexe trouve donc tout son intérêt pour l'identification de *Culicoides* adultes mais également pour les larves qui, elles aussi, sont difficiles à différencier. Cinq couples d'amorces ont été dessinés afin de permettre la détection de chacune de ces espèces par une PCR multiplexe (Mathieu *et al.*, 2007). Le profil présenté en Figure 8 a été obtenu, avec la présence d'une bande commune à 166 bp pour toutes les espèces, ensuite une bande additionnelle à 78 bp, 117 bp et 302 bp est présente respectivement pour *C. dewulfi*, *C. chiopterus* et *C. obsoletus*.

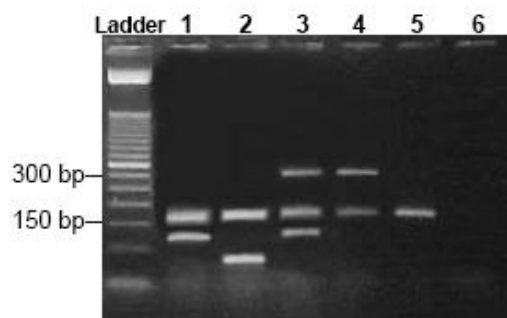
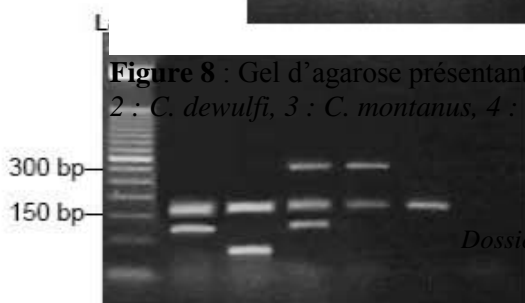


Figure 8 : Gel d'agarose présentant les amplicons de la PCR multiplexe *Obsoletus* groupe – (1 : *C. chiopterus*, 2 : *C. dewulfi*, 3 : *C. montanus*, 4 : *C. obsoletus* ss, 5 : *C. scoticus* ss)–



Conclusion et Perspectives :

Les résultats obtenus avec la PCR multiplexe pour les espèces du groupe *Obsoletus* sont très encourageants et ont permis d'initier le développement d'une PCR en temps réel de type TaqMan avec plusieurs sondes spécifiques de chacune des espèces à détecter. Ce travail est en cours et fait partie intégrante du travail de la thèse de Bruno Mathieu.

Les résultats présentés dans le sous-chapitre 4.2 ont fait l'objet des publications suivantes :

Cêtre-Sossah C., T. Baldet, JC. Delécolle, B. Mathieu, A. Perrin, C. Grillet and E. Albina. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Research*. **2004**. 35 :325-337.

Perrin A., **Cêtre-Sossah C.**, T. Baldet, JC. Delécolle, B. Mathieu, E. Albina. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med. Vet. Entomol*. **2006**. 20(2):219-28.

Mathieu B., A. Perrin, T. Baldet, JC. Delécolle, , E. Albina and **Cêtre-Sossah C.** Molecular identification of the *Obsoletus* complex species larvae (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1r DNA multiplex PCR assay: new approach of vector ecology in bluetongue. *Journal of Medical Entomology*. **2007**. 44 (6):1019-1025.

Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci*. **2008**. 85(2):372-82.

Sur la thématique de la détection moléculaire des *Culicoides*, deux stages de DEA ont été validés (Aurélien Perrin en 2004 et Bruno Mathieu en 2005) et une thèse est en cours actuellement, celle de Bruno Mathieu.

Ces travaux relatifs à la détection moléculaire des insectes vecteurs de la FCO m'ont permis d'appréhender le milieu de la recherche en santé animale et le terrain qui lui est associé et d'approfondir mes connaissances en biologie moléculaire. Ces connaissances me sont très utiles pour mener à bien une autre thématique sur laquelle je travaille: l'élaboration de vaccins recombinants grâce à des vecteurs de type capripoxvirus. Après une rapide bibliographie des poxviroses (Paragraphes 4.3.1 et 4.3.2), les objectifs de mon travail seront présentés suivis des premiers résultats générés pour les vaccins recombinants pour la FCO (Paragraphe 4.3.4) et ceux pour la FVR (Fièvre de la Vallée du Rift) et la PPR (Peste des Petits Ruminants) (Paragraphe 4.3.5).

4.3 Les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux

4.3.1. Classification et épidémiologie des Poxvirus

La famille des *Poxviridae* est organisée en deux sous-familles, les *Chordopoxvirinae* infectant les vertébrés (Fauquet *et al.*, 2005) et les *Entomopoxvirinae* infectant les invertébrés. Les *Chordopoxvirinae* sont organisés en 8 genres (Buller & Palumbo, 1991) référencés dans le tableau 2 ci-dessous.

Genre	Virus types	Réservoirs
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole bovine (cowpox)	Bovins, Félins, Humains, Rongeurs
	Virus Ectromélie	Rongeurs
	Virus de la variole du chameau (camelpox)	Camélidés
	Virus de la variole humaine (smallpox)	Humains
	Virus de la vaccine*	Réservoir très large
<i>Parapoxvirus</i>	Virus de l'ecthyma contagieux (Orf)	Ovins, Caprins
	Virus de la paravaccine (pseudocowpox)	Bovins, Humains
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire (canarypox, fowlpox)	Oiseaux
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la variole ovine (sheeppox)	Ovins
	Virus de la variole caprine (goatpox)	Caprins
	Virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Lumpy skin disease virus)	Bovins
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose du lapin	Lapins
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	Porcins
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus Molluscum contagiosum	Humains
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus de la tumeur Yaba du singe	Singes, et parfois Humains
	Virus Tana	

Tableau 2 - Classification de la sous-famille des *Chordopovirinae*

Adapté de Bertagnoli, 2003, * Réservoir d'hôtes extrêmement large d'où son utilisation massive en tant que vecteur vaccinal (Pastoret *et al.*, 1996).

Les membres d'un même genre sont caractérisés par une morphologie et des propriétés biologiques identiques (Moss, 1996). Les membres du genre *Orthopoxvirus* et en particulier le virus de vaccine, sont les virus les plus étudiés parmi la famille des *Poxviridae*. Le genre *Capripoxvirus*, comprend trois virus affectant les ruminants ; le virus de la clavelée du mouton, le virus de la variole caprine et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse.

La clavelée du mouton, ou variole ovine (sheeppox), est signalée depuis le premier siècle après JC. Depuis, de nombreuses épizooties, ont été rapportées en Europe et dans le bassin méditerranéen. La première description de la variole caprine (goatpox) a été faite en 1879, en Norvège, par Hansen. Tout comme la clavelée du mouton, la variole caprine a été signalée depuis sur les pays du pourtour méditerranéen (Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003). Actuellement on retrouve ces maladies en Afrique du Nord, Afrique subsaharienne, Asie et Moyen Orient (Figure 9). Dans les conditions naturelles, les virus de la clavelée et de la variole caprine sont pathogènes exclusivement pour l'espèce ovine et l'espèce caprine respectivement.

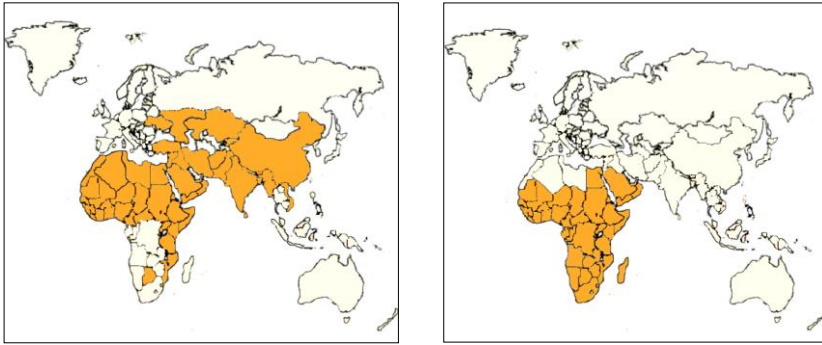


Figure 9 – a Répartition géographique de la clavelée du mouton et de la variole caprine. **Adapté de Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003.** **b** Répartition géographique de la dermatose nodulaire contagieuse. **Adapté de Lefèvre & Gourreau, 2003.**

Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou Lumpy skin disease virus est décrit pour la première fois par McDonald en 1929 en Zambie. La maladie est cantonnée à l'Afrique australe jusqu'en 1950 puis elle gagne l'Afrique de l'Est et la Madagascar. Depuis les années 1970, la maladie est enzootique sur le continent africain jusqu'au Sud du Sahara ainsi qu'au Moyen Orient (Figure 9) (Lefèvre & Gourreau, 2003). Seuls les bovins et les zébus présentent des signes cliniques de la maladie. Cependant, le premier cas de dermatose nodulaire signalé au Kenya a été observé sur des ovins (Davies, 1976), la souche ainsi isolée (KS-1 pour Kenya sheep-1) a été rapprochée, par la suite, du virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Kitching *et al.*, 1989; Le Goff *et al.*, 2009; Tulman *et al.*, 2001). La présence d'anticorps anti-LSDV a été signalée chez des animaux sauvages tels que les springboks (D. Wallace, communication personnelle)

4.3.2. Etiologie des Poxvirus et vaccins

Les poxvirus, virus à ADN, diffèrent de la plupart des autres virus par leur grande taille, la complexité de leur structure, leur multiplication intra cytoplasmique et leur très grande résistance dans le milieu extérieur. Le génome des *Poxviridae*, est composé d'un ADN double brin linéaire, d'une taille comprise entre 130 et 375 kpb (Moss, 1992).

Les virions, de forme ovoïde, ont une taille comprise entre 200 et 400 nm et sont organisés en un core central biconcave ou nucléosome contenant le génome et 2 corps latéraux

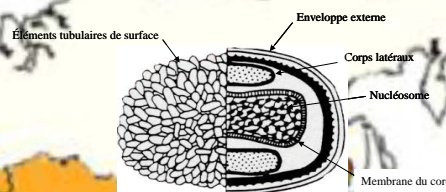


Figure 10 - Représentation schématique de la structure d'un *Poxvirus* Adapté de Bertagnoli, 2003

La partie essentielle du génome est la région centrale, fortement conservée au sein du genre et composée de gènes intervenant dans la réplication du virus ainsi que dans la synthèse des protéines de structure. Les régions situées aux extrémités sont composées de gènes non essentiels impliqués notamment dans la virulence. Le génome est associé à une ARN polymérase virale. Le séquençage du virus de la variole ou de la vaccine a permis de dénombrer environ 200 gènes (Goebel, 1990). Fait unique chez les virus à ADN, la réplication

des poxvirus se déroule dans son intégralité dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent (Moss *et al.*, 1996) et sa durée varie selon la nature du virus et l'origine de la cellule.

Des vaccins à virus vivants atténués sont disponibles pour toutes les poxviroses d'importance vétérinaire, induisant tous une immunité solide et de longue durée. Dans le cas de la dermatose nodulaire contagieuse, deux souches sont couramment utilisées dans des campagnes de vaccination, la souche Neethling (originaire d'Afrique du Sud) et la souche KS-1 (originaire d'Afrique de l'Ouest). Cette dernière est thermorésistante, son pouvoir de diffusion est très limité et son pouvoir pathogène résiduel se caractérise par des lésions noduleuses disparaissant en quelques jours chez la chèvre et le mouton avec des effets indésirables chez certaines races sensibles de bovins (Yeruham *et al.*, 1994). Toutefois, cette même souche recombinée avec un antigène de la peste bovine n'a induit que des papules au point d'injection se résorbant rapidement chez les bovins (Romero *et al.*, 1993).

4.3.3 Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux

4.3.3.1 Propriétés

De nombreux virus animaux ont été utilisés comme vecteur d'expression de gènes hétérologues (Rigby, 1983). Ainsi, les papillomavirus bovins (Sarver *et al.*, 1981), les adénovirus (Solnick, 1981; Thummel *et al.*, 1981; Holman *et al.*, 2009), et certains membres de la famille des rétrovirus (Shimotohno & Temin, 1981; Wei *et al.*, 1981), ont été très largement utilisés comme vecteurs d'expression. Cependant, la relative petite taille de leur génome, facilitant leur manipulation, s'avère être une contrainte importante concernant les quantités d'ADN qu'ils peuvent intégrer au sein de leur génome. De plus, ces virus ont généralement une spécificité d'hôte étroite et ils requièrent des lignées cellulaires spécifiques pour leur réplication.

La grande taille, la spécificité d'hôte, et la capacité d'exprimer des transgènes dans des espèces non cibles ont fait du virus de la vaccine et des poxvirus en général des vecteurs d'expression de choix. De nombreuses souches ont été utilisées en tant que vaccins vivants atténués en raison de leur grande efficacité et de l'immunité protectrice obtenue sur le long terme après seulement une seule injection. Le virus de la vaccine a été le premier poxvirus à être employé comme vecteur vaccinal, il y a une vingtaine d'années (Mackett *et al.*, 1985; Mackett & Smith, 1986; Paoletti *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1984). Cependant, l'utilisation de souches répliquatives de ce virus s'est avérée limitée. Le virus de la vaccine a une très large spécificité d'hôte et est ainsi capable d'infecter de nombreuses espèces animales, en plus de celles ciblées pour la vaccination. Depuis ces premiers travaux, de nouvelles méthodes de constructions et des études sur des vecteurs non répliquatifs dans les cellules de mammifères ont été développées.

On dispose aujourd'hui d'un large ensemble de vecteurs dérivés de différents poxvirus, inoffensifs pour le manipulateur et pouvant être employés pour des études en culture cellulaire, chez l'animal ou chez l'homme. Convenablement atténués, ils constituent des vaccins recombinants intéressants non seulement chez leurs hôtes naturels mais également chez des hôtes hétérologues.

Les avantages liés à l'utilisation des poxvirus en tant que vecteurs viraux vaccinaux sont liés à :

- la flexibilité de leur génome (des insertions de plus de 30 kpb au sein de leur génome sans perte d'infectivité (Smith *et al.*, 1984)
- leur grande capacité de croissance permettant la production de stocks importants de virus
- leur multiplication exclusivement intra-cytoplasmique limitant les risques d'intégration ou de recombinaison génétique avec l'ADN de l'hôte

- leur utilisation en tant que vaccins multivalents (Perkus *et al.*, 1985, 1991)
 - l'induction d'une immunité sur le long terme après une seule injection, en stimulant à la fois la réponse humorale et cellulaire contre le transgène (Zavala *et al.*, 2001; Andrew & Coupar, 1993, Pastoret & Vanderplasschen, 2003)
 - leur très grande résistance et stabilité (à de fortes chaleurs ainsi qu'à la lyophilisation (Collier, 1955)
 - leur facilité et faible coût de production
 - la possibilité de développer des techniques permettant une différenciation entre animaux vaccinés et infectés (Vaccins DIVA).

4.3.3.2 Les poxvirus en tant que vecteurs d'expression

Le premier poxvirus recombinant à avoir été utilisé sur la faune sauvage est le recombinant vaccine rage, V-RG (Blancou *et al.*, 1986; Brochier *et al.*, 1989; Pastoret & Brochier, 1992) pour la vaccination orale de renards. V-RG a été construit par insertion du gène codant pour la glycoprotéine du virus de la rage dans le gène de la thymine kinase (TK) de la souche Copenhague du virus de la vaccine (Kieny *et al.*, 1984). En raison de sa thermostabilité et de sa voie d'inoculation (voie orale), il a pu être distribué sous forme d'appâts pour immuniser la faune sauvage (Pastoret *et al.*, 1988). Son utilisation massive dans toute l'Europe a permis une élimination progressive de la rage (Brochier *et al.*, 1991; 2001).

D'autres exemples tels que le virus de la vaccine, exprimant les antigènes de surface du virus de l'hépatite B, la glycoprotéine D du Herpes Simplex Virus (HSV) et l'hémagglutinine du virus influenza permettent de mettre en évidence une réponse immunitaire dirigée contre les trois transgènes (Perkus *et al.*, 1985) chez des lapins. D'autres succès vaccinaux sont également attribués aux vecteurs fowlpoxvirus et canaripoxvirus. Ainsi, le développement récent et la commercialisation d'un vecteur vaccinal fowlpoxvirus exprimant le gène de l'hémagglutinine du virus influenza aviaire H5N1 s'est révélé d'une grande efficacité chez des poussins éprouvés avec une souche virulente (Bublott *et al.*, 2006). La souche ALVAC du canaripoxvirus est également très utilisée dans le domaine vétérinaire notamment contre le virus de la West-Nile (Karacca *et al.*, 2005; Minke *et al.*, 2004).

Les techniques les plus couramment utilisées pour l'insertion de gènes rapporteurs au sein du génome des poxvirus sont basées soit sur une recombinaison homologue entre un plasmide de transfert et le génome du poxvirus (Mackett *et al.*, 1982; Piccini *et al.*, 1987) soit par ligation directe d'ADN (Timiryasova *et al.*, 2001). La technique qui a été utilisée au cours de ce projet est la technique de recombinaison homologue. Le principe de génération de capripoxvirus recombinants est le suivant: un plasmide de transfert contenant le gène d'intérêt à exprimer et les parties flanquantes du site d'insertion choisi, est transfecté *in vitro* dans des cellules préalablement infectées avec une souche vaccinale atténuée de capripoxvirus, dans notre cas la souche vaccinale KS-1. Il s'effectue alors, entre le plasmide de transfert et l'ADN génomique viral du poxvirus, au niveau du site d'insertion choisi, une double recombinaison homologue. Dans notre cas, la cassette d'expression du plasmide de transfert s'intègre donc dans le gène de la thymidine kinase (TK), gène non essentiel à la survie du capripoxvirus. Le taux d'évènements de recombinaison, dans les cellules infectées par les poxvirus, est relativement faible, environ 1 pour 10 000 (Franke *et al.*, 1985) et la quasi-totalité de la population de virus néoformés reste de type parental c'est-à-dire non recombinant (Moss, 1992).

Une fois les virus recombinants générés, il est alors possible d'entrer dans une phase de purification de ces derniers en éliminant les virus non recombinants par pression de sélection. De multiples approches ont été explorées afin de faciliter l'élimination des virus

non recombinants notamment par l'utilisation d'un marqueur de sélection permettant une sélection par:

- Coloration, comme la β -galactosidase et la β -glucuronidase (GUS) (Chakrabarti *et al.*, 1985; Panicali *et al.*, 1986; Carroll & Moss, 1995).
- Fluorescence, grâce à la GFP (green fluorescent protein) (Dominguez *et al.*, 1998, Wallace *et al.*, 2007).
- Résistance à un antibiotique tel que la néomycine (Franke *et al.*, 1985; Katz & Middle, 1990), la puromycine (Sanchez-Puig & Blasco, 2000) ou l'acide mycophénolique, MPA (Falkner & Moss, 1988 ; Boyle *et al.*, 1988).

Plus récemment, Hansen et ses collaborateurs, ont développé une enzyme bi fonctionnelle (Bizyme) combinant la fluorescence et la résistance antibiotique qui permettrait une sélection plus simple et plus rapide des virus recombinants (Hansen *et al.*, 2002).

Malgré la quantité de marqueurs disponibles, très peu s'avèrent complètement efficaces, le virus non recombinant pouvant alors persister sur plusieurs passages sélectifs. Les marqueurs de sélection visuelle (GUS, GFP) permettent une visualisation des virus recombinants mais n'exercent aucune pression de sélection sur les virus sauvages et ne permettent donc pas leur élimination. Les antibiotiques, tels que la néomycine ou la puromycine engendrent une forte mortalité cellulaire sur de nombreuses lignées cellulaires. Le gène de la guanosine phosphoribosyle transférase d'*Escherichia coli* (*Ecogpt*), qui code pour une résistance à l'acide mycophénolique, s'avère être une des méthodes, *a priori*, les plus efficaces et les plus couramment utilisées (Berhé *et al.*, 2003; Falkner & Moss, 1988; Romero *et al.*, 1993;1994) et celle que nous avons choisi.

4.3.3.3 Les capripoxvirus en tant que vecteurs d'expression

Le genre *Capripoxvirus* inclut les virus de la variole ovine ou clavelée du mouton, le virus de la variole caprine et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou Lumpy skin disease virus (LSVD). Ces virus sont responsables de maladies infectieuses, contagieuses, inoculables et infectant respectivement, les caprins, les ovins et les bovins. Les *Capripoxvirus* ont des propriétés immunologiques communes qui induisent une protection croisée entre les différents membres du genre (Kitching *et al.*, 1986). L'utilisation de souches atténuées protège ainsi contre les trois infections à *Capripoxvirus* (Kitching *et al.*, 1987).

En raison de sa spécificité d'hôte et de son apathogénicité sur les hommes et les animaux, le virus de la dermatose nodulaire contagieuse est considéré comme un des vecteurs potentiels prometteurs dans le domaine vétérinaire. Un vaccin atténué LSVD exprimant des antigènes étrangers peut être utilisé à la fois contre une infection hétérologue et contre les infections à *Capripoxvirus*. Ainsi, ce système a été très largement utilisé dans la recherche de vaccins contre la peste bovine, la peste des petits ruminants (Berhé *et al.*, 2003; Diallo *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 1993) et la fièvre de la vallée du rift (Wallace *et al.*, 2005; 2006). Romero *et al.*, 1994 ont montré que la souche KS-1 exprimant la protéine de fusion du virus de la peste bovine protège totalement le bétail contre une épreuve virulente de peste bovine et de LSDV. Le même type de résultats a été obtenu par Berhé *et al.*, 2003 avec un vaccin recombinant exprimant la protéine H du virus de la peste des petits ruminants avec l'obtention d'une protection totale même avec une dose aussi faible que 10^2 TCID₅₀/ml.

Cadre et Objectifs du travail concernant le développement de vaccins recombinants à base de vecteurs viraux de type poxvirus

Les objectifs du travail concernant le développement de vaccins recombinants à base de vecteurs viraux de type poxvirus visent 3 pathologies importantes sévissant en Afrique et dans les pays du Sud de façon plus générale chez les petits ruminants: la FCO, la PPR et la FVR.

L'objectif premier est le développement d'un vaccin thermostable, unidose, à capacité de croissance importante permettant la production de stocks vaccinaux à faible coût. Les vaccins de type poxvirus permettent d'atteindre cet objectif tout en induisant une immunité sur le long terme en stimulant la réponse humorale et cellulaire contre le(s) transgène(s) d'intérêt. Ils permettent également le développement de techniques de diagnostic visant une différenciation entre animaux vaccinés et animaux infectés (DIVA).

- 1- **Concernant la FCO**, huit sérotypes du virus de la FCO sévissent actuellement en Europe. Trois types de vaccins ont été développés jusqu'ici, ils présentent tous des avantages et des inconvénients
 - a- Les vivants atténués, produits à partir de souches possédant un pouvoir pathogène spontanément avirulent ou à partir de souches atténuées par passages multiples en culture cellulaire. Ils sont sérotype spécifiques, et peuvent être multivalents. Ce type de vaccins est facile à produire, peu coûteux, administrable en une seule injection et induit une réponse immunitaire de longue durée. D'autres inconvénients ont été rapportés tels que des effets tératogènes sur le développement fœtal ont été observés chez des femelles gestantes (Murray & Eaton, 1996), la possibilité de transmission des vaccins atténués aux vecteurs *Culicoides*, une recombinaison entre les souches sauvages et les souches atténuées possible, une réversion de virulence, aucune différenciation entre les animaux vaccinés et les animaux infectés n'est possible avec ce type de vaccins.
 - b- Les vaccins à virus inactivés représentent une alternative aux vaccins atténués. Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur, UV) ou chimique (formol, bétapropiolactone, éthylèneimine) ce qui entraîne une perte totale d'infectivité sans dénaturer le pouvoir immunogène (Campbell, 1985; Parker *et al.*, 1975; Stevens *et al.*, 1985; Stott *et al.*, 1979; Stott *et al.*, 1985). Ce type de vaccins offre un certain nombre d'avantages, notamment l'impossibilité de répllication du virus, de transmission aux vecteurs donc de réassortiments entre les souches et de réversion de virulence, en revanche ils nécessitent généralement une dose rappel trois semaines après la première injection, en présence d'adjuvants, ils restent spécifiques d'un sérotype donné et ne permettent pas non plus de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.
 - c- Les gènes codant pour des protéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée peuvent être clonés dans un vecteur (bactérie, virus) tel que le système baculovirus très utilisé pour la production de structures protéiques reconstituant le core (core-like particles, CLPs) (French & Roy, 1990; French *et al.*, 1990) ou reconstituant le virus (virus-like particles VLPs). Des vaccins utilisant des antigènes composés de pseudo-particules constituées de protéines de structure VP2-VP5 du virus de la FCO ont donné des résultats prometteurs en procurant une protection totale contre un challenge homologue après 2 injections mais n'ont jamais été commercialisés (Roy *et al.*, 1990b; 1992; 1994a; 1994b; Johnson et Roy, 1996; Urakawa *et al.*, 1994). Ce type de vaccins (VLPs, CLPs ou recombinants) reste toutefois spécifique d'un sérotype donné et nécessite

une bonne formulation pour atteindre une conservation et une stabilité correctes. Ce type de vaccins ouvre en revanche la possibilité de développer des vaccins marqués permettant le diagnostic DIVA.

Les vaccins recombinants poxviraux protégeant contre la FCO ont également été très largement testés mais restent à l'état de développement en recherche et ne sont pas commercialisés (Boone *et al.*, 2007; Lobato *et al.*, 1997, Wade-Evans *et al.*, 1996).

Nous avons choisi d'utiliser comme vecteur d'expression le virus de la dermatose nodulaire contagieuse. Le choix des gènes exprimés s'est porté en priorité sur les gènes du virus de la FCO les mieux conservés entre sérotypes pour permettre une protection multi-sérotypes, à savoir les gènes codant pour les protéines non structurales, NS1, NS2, NS3 et le gène codant pour la protéine constitutive de la capsid interne, VP7. Nous avons également choisi d'inclure dans notre étude le gène codant pour la protéine de la capsid externe, VP2, épitope neutralisant majeur, ceci afin de valider notre système vaccinal en épreuve homologue. Les travaux concernant le vaccin FCO sont présentés dans le paragraphe 4.3.4.

- 2- **Concernant la PPR et la FVR**, un certain nombre de vaccins ont été développés et sont présentés dans les paragraphes correspondants. Ils présentent tous des avantages (facilité de production à faible coût, bonne immunité protectrice) et des inconvénients. Aucun d'entre eux ne possède les caractéristiques suivantes : thermostabilité, induction d'une immunité protectrice en une seule injection, développement de tests de diagnostic DIVA possible. La FVR et la PPR sévissent dans les mêmes régions, d'où notre projet d'élaborer une stratégie vaccinale commune à partir d'un capripoxvirus recombinant portant les 2 valences FVR et PPR dans 2 sites d'insertion différents, ce qui pour l'instant n'a jamais été expérimenté et représente un défi. Pour ces 2 pathologies, les protéines immunogènes ont été facilement sélectionnées suite à des travaux déjà publiés, il s'agit de la protéine H pour la PPR (Diallo *et al.*, 2002) et de la glycoprotéine GN pour la FVR (Keegan *et al.*, 1986; Schmaljohn *et al.*, 1989). Les premiers résultats sont présentés dans le paragraphe 4.3.5.

4.3.4. Etude de faisabilité d'un vaccin capripoxvirus recombinant contre la FCO protégeant contre plusieurs sérotypes

4.3.4.1 Le virus de la FCO

L'agent responsable de la FCO est un virus non enveloppé avec une capsid à symétrie icosaédrique dont la taille varie entre 60 et 80 nm, de la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus* (Borden *et al.*, 1971). Le génome viral, logé au sein de la capsid interne, est composé de 10 segments d'ARN double brin de tailles différentes. La taille totale du génome est d'environ 19200 bases. Le tableau 3 présente les caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO ainsi que leur produits d'expression. Les protéines peuvent être classées en deux catégories, les protéines structurales (VP1 à VP7) et les protéines non structurales (NS1 à NS3) (Verwoerd, 1969). Une représentation schématique de la structure du virus de la FCO est donnée en Figure 11. La protéine VP2, constituant majeur de la capsid externe, est la protéine la moins conservée de toutes les protéines (Mertens *et al.*, 1987; Roy *et al.*, 1989) et est l'antigène spécifique de type (Cowley & Gorman, 1989; Huismans & Van Disjk, 1990; Mertens *et al.*, 1987; 1989; Roy *et al.*, 1989). La capsid interne (ou core) est composée de deux protéines structurales majeures, VP7 et VP3 et de trois protéines structurales mineures, VP1, VP4 et VP6 (Howell, 1960; Huismans, 1987; Huismans & Van Disjk, 1990; Mertens, 1987). La protéine VP7 est le composant majeur de la capsid

interne du virus et possède également des déterminants antigéniques de groupe (Huisman & Van Disjk, 1990; Roy *et al.*, 1989; Gumm & Newman, 1982). La matrice (ou subcore) est composée par la protéine VP3, qui interagit de manière forte avec les trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6 (Gouet *et al.*, 1999; Grimes *et al.*, 1998); ces trois dernières constituant le complexe de transcription (Albina *et al.*, 2007). La protéine VP3 est une protéine qui possède des déterminants antigéniques spécifiques du groupe (Roy, 1992; Iwata *et al.*, 1992).

Segments (taille en pb)	Protéines	Masse molaire (Da) ^{1,2}	Localisation ^{5,6,7,8}	Nombre de molécules par virion ^{3,4}	Propriétés
1 (3954)	VP1	149 588	Protéine mineure de la capside interne	11	Antigène de groupe ARN polymérase ARN dépendante ^{9,10}
2 (2926)	VP2	111 112	Protéine majeure de la capside externe	180	Spécificité de type ^{6,8,11,12,13} Antigène protecteur ¹⁴ Ligand récepteur cellulaire ^{8,14} Protéine la plus variable ^{8,13}
3 (2770)	VP3	103 344	Protéine majeure de la capside interne	120	Antigène de groupe Contrôle la taille et l'organisation de la structure de la capside ^{15,16} Interagit avec les protéines mineures du subcore ^{15,16}
4 (1981)	VP4	76 433	Protéine mineure de la capside interne	9	Guanylyltransferase ¹⁷
5 (1769)	NS1	64 445	Protéine non structurale	0	Forme des tubules dans le cytoplasme des cellules ^{18,19}
6 (1638)	VP5	59 163	Protéine majeure de la capside externe	292	Spécificité de groupe ^{8,11,12}
7 (1156)	VP7	38 548	Protéine majeure de la capside interne	780	Intervient dans l'entrée dans la cellule ^{20,21} Antigène de groupe ^{3,13,22}
8 (1124)	NS2	40 999	Protéine non structurale	0	Associée aux corps d'inclusion ^{23,24} Fixe les ARN messagers ²⁵
9 (1046)	VP6	35 750	Protéine mineure de la capside interne	67	Antigène de groupe Fixe les ARN sb et db ²⁶ Hélicase ²⁷
10 (822)	NS3/NS3A	25572 / 24020	Protéines non structurales	0	Glycoprotéine ^{28,29} Libération des virions ^{30,31}

Tableau 3 - Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO

Adapté de ¹ Roy, 1992; ² 1989; ³ Huisman & Vandisjk, 1990; ⁴ Pedley *et al.*, 1988; ⁵ Hewat *et al.*, 1992a; ⁶ Huisman & Vandisjk, 1990; ⁷ Mertens *et al.*, 1984; ⁸ Mertens *et al.*, 1987; ⁹ Roy *et al.*, 1988; ¹⁰ Urakawa *et al.*, 1989; ¹¹ Cowley & Gorman, 1989; ¹² Mertens *et al.*, 1989; ¹³ Roy *et al.*, 1989; ¹⁴ Huisman *et al.*, 1987; ¹⁵ Gouet *et al.*, 1999; ¹⁶ Grimes *et al.*, 1998; ¹⁷ Le Blois *et al.*, 1992; ¹⁸ Hewat *et al.*, 1992b; ¹⁹ Huisman & Els, 1979; ²⁰ Mertens *et al.*, 1996; ²¹ Xu *et al.*, 1997; ²² Gumm & Newman, 1982; ²³ Brookes *et al.*, 1993; ²⁴ Thomas *et al.*, 1990; ²⁵ Kar *et al.*, 2007; ²⁶ Theron *et al.*, 1994; ²⁷ Roy *et al.*, 1990a; ²⁸ Stauber *et al.*, 1997; ²⁹ Wu *et al.*, 1992; ³⁰ Bansal *et al.*, 1998; ³¹ Hyatt *et al.*, 1993.

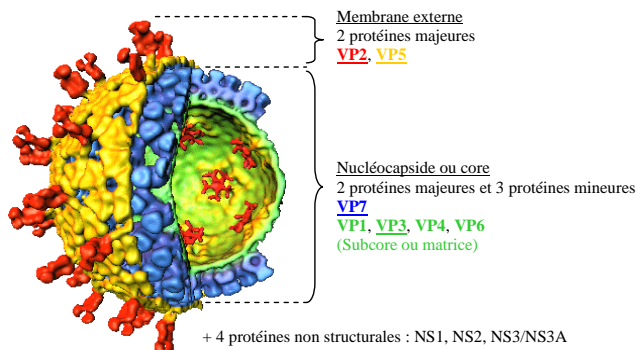
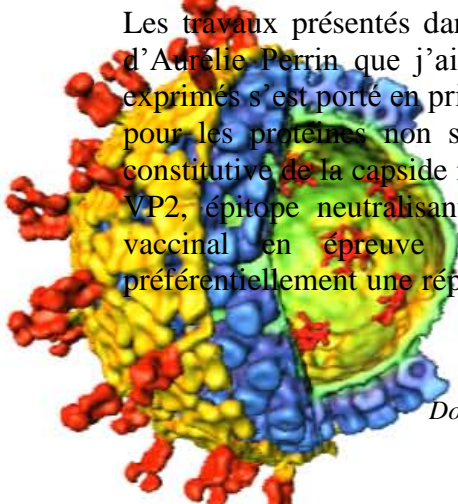


Figure 11 - Représentation schématique de la structure du virus de la FCO

4.3.4.2 Evaluation de l'immunogénicité et de la protection du vaccin capripox recombinant contre la FCO

Les travaux présentés dans ce sous-chapitre correspondent à ceux réalisés lors de la thèse d'Aurélien Perrin que j'ai encadrée. En ce qui concerne notre vaccin, le choix des gènes exprimés s'est porté en priorité sur les gènes les mieux conservés entre sérotypes, ceux codant pour les protéines non structurales, NS1, NS2, NS3 et le gène codant pour la protéine constitutive de la capside interne, VP7. Le gène codant pour la protéine de la capside externe, VP2, épitope neutralisant majeur, a été choisi également afin de valider notre système vaccinal en épreuve homologue. Les vecteurs de type capripoxvirus induisent préférentiellement une réponse de type cellulaire contre le transgène, susceptibles de conférer



une immunité protectrice contre tous les sérotypes du virus lorsqu'elle est dirigée contre des antigènes conservés.

Dans la littérature, il a été montré que les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) jouent un rôle important chez le mouton dans la protection contre le virus de la FCO avec un pic maximal 14 jours après infection (Jeggo *et al.*, 1985). Ils reconnaissent fortement les protéines NS1 et un peu moins les protéines VP2, VP3, VP5 et VP7 (Janardhana *et al.*, 1999). L'objectif de ce projet était de générer des LTC mémoires contre des antigènes conservés pour protéger l'espèce animale concernée contre un maximum de sérotypes. L'expression de différentes protéines du virus de la FCO via un vecteur de type poxvirus permet de générer des réponses immunes protectrices, ainsi un capripoxvirus recombinant VP7 a déjà apporté une protection contre le sérotype homologue et une protection partielle contre un sérotype hétérologue (Wade-Evans *et al.*, 1996). Lobato *et al.*, 1997 et Boone *et al.*, 2007 ont également démontré la capacité de vecteurs recombinants de type vaccine et canarypoxvirus respectivement exprimant les protéines de la capsid externe, VP2 et VP5 de la FCO, à générer une protection contre le sérotype homologue. Par ailleurs les protéines NS2 et NS1 ont été montré comme étant capables de générer des LTC chez la souris (Jones *et al.*, 1997) et chez le mouton (Andrew *et al.*, 1995) respectivement.

Notre objectif était donc d'évaluer la capacité de notre vecteur de type capripoxvirus, recombinant pour quatre protéines différentes du virus de la FCO, à améliorer ce type de réponse par l'induction d'une protection chez les petits ruminants contre plusieurs sérotypes et la stimulation d'une réponse immunitaire spécifique.

Les différentes étapes de construction de nos recombinaunts capripoxviraux protégeant contre la FCO

1-Construction du plasmide de transfert utilisé lors de la recombinaison homologue lors de l'étape de transfection avec le capripoxvirus pour chacun des 4 gènes (VP2, VP7, NS1 et NS3)

Le choix du site d'insertion dans le génome du capripoxvirus pour ces recombinants s'est porté sur le gène de la TK (Dubbs *et al.*, 1964, Wallace and Viljoen, 2005). Ainsi le plasmide comporte les parties flanquantes TKg et TKd présentes dans le génome du capripoxvirus, éléments clefs permettant la recombinaison, le gène de sélection Ecogpt et les gènes clonés dans le site de clonage comme présenté dans la Figure 12 (Boyle *et al.*, 1985). Chaque gène d'intérêt a été cloné individuellement dans le site de clonage multiple du plasmide de transfert.

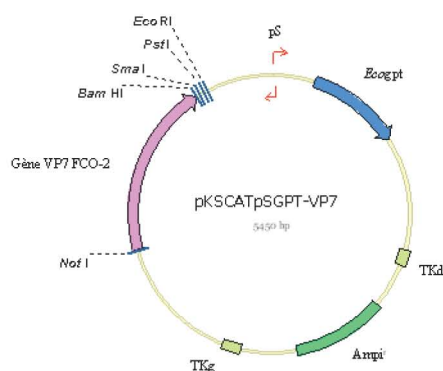


Figure 12 : Carte de restriction du plasmide navette portant le gène VP7 du sérotype 2 de FCO

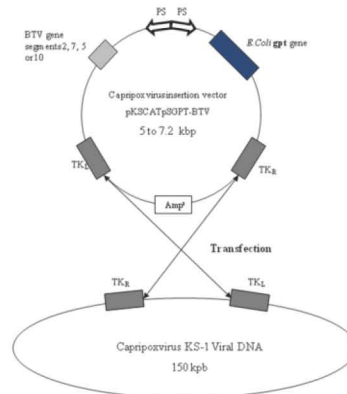


Figure 13 : Etape de recombinaison homologue

2-Vérification de la fonctionnalité du plasmide par expression transitoire

La figure 14 présente le témoin négatif (a) et le témoin positif (b) correspondant respectivement aux cellules OA3Ts non infectées et aux cellules transfectées avec un plasmide exprimant la «green fluorescent protein». Ces contrôles ont suivi le même protocole de fixation et de marquage que les échantillons. La figure 14 (c) présente le niveau d'expression du plasmide de transfert exprimant le gène de la VP7, pKSCATpSGPT-VP7.

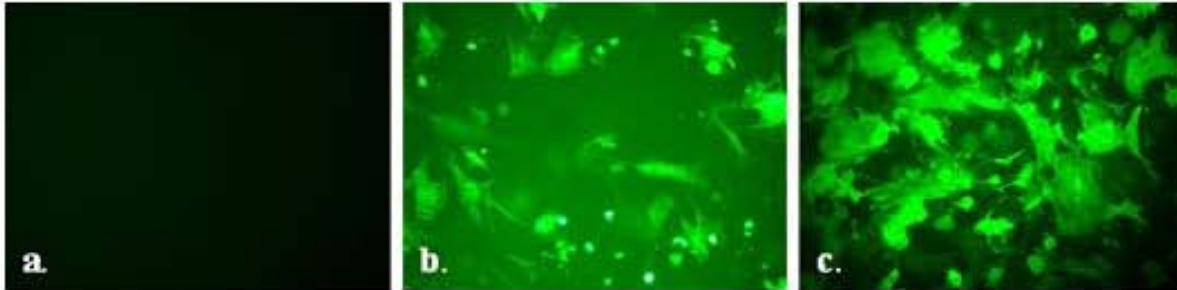


Figure 14 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP7- Microscope optique à fluorescence x10

a- témoin négatif cellules, b- témoin positif pEGFP, c- pKSCATpSGPT-VP7 après 48h d'incubation

3-Transfection et Purification

L'étape de transfection ou recombinaison homologue (Figure 14) s'est faite sur des cellules OA3Ts en présence de la souche virale KS-1 (Kenya Sheep) (MOI de 0.1), d'une quantité donnée de plasmides de transfert, d'ADN du virus KS1 et de Lipofectamine 2000 comme décrit par Romero *et al.*, 1993. La sélection des virus recombinants et leur purification s'est faite avec le même marqueur de sélection négatif ecogpt.

4-Evaluation de l'immunogénicité et de la protection des constructions VP2, VP7, NS1, NS3

L'évaluation de l'immunogénicité et de l'effet protecteur de ces constructions s'est faite par des expérimentations animales avec les virus recombinants purifiés et 2 modèles d'espèces : les caprins et les ovins. Une première expérience chez les chèvres a permis de tester l'immunogénicité des constructions (analyse de la réponse immunitaire de type humorale et de type cellulaire). Une seconde, chez les moutons, a permis de reproduire les résultats obtenus chez les chèvres et d'évaluer l'effet protecteur des réponses induites par la présence/absence de signes cliniques après épreuve virulente (sérotypage 2-FCO).

Ci-dessous, le protocole d'administration employé :

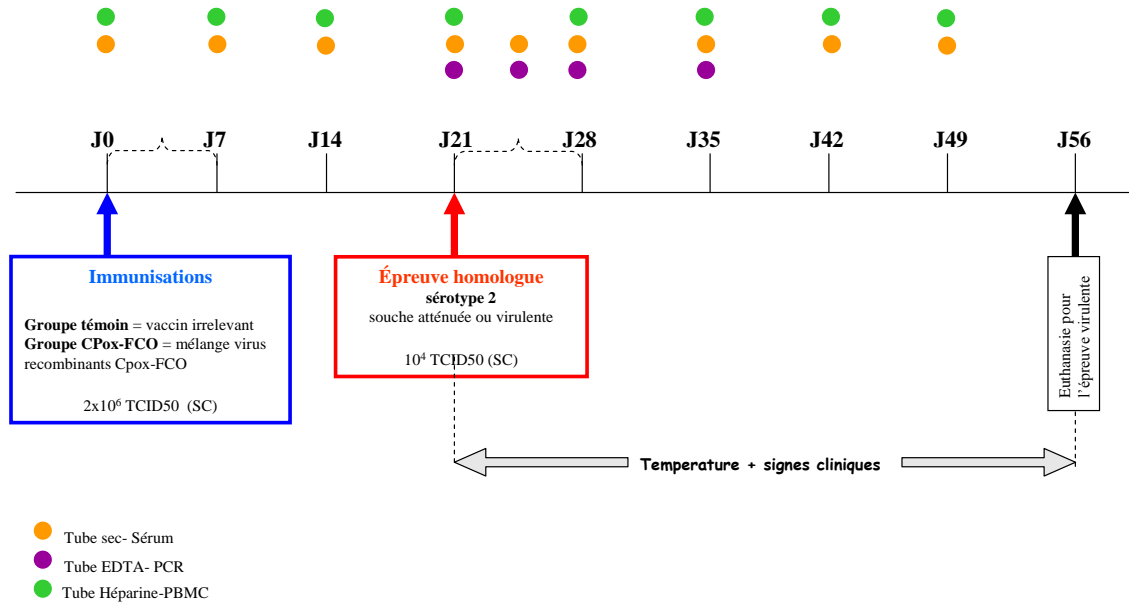


Figure 15 : Représentation schématique du calendrier expérimental des essais capripoxvirus recombinants.

- *Analyse de la réponse immunitaire*

Les réponses immunitaires ont été suivies pour tous les gènes par ELISA (VP7, NS1, NS3) ou séroneutralisation (VP2). A titre d'exemples, la Figure 16 présente les réponses anti-NS3 et anti-VP7 respectivement, chez les chèvres (a) et chez les moutons (b). Il a pu être noté une augmentation significative des anticorps à la 4^{ème} semaine suivant l'inoculation avec un boost à J35 chez les animaux du groupe CPOX-FCO comparativement aux animaux de groupe témoin.

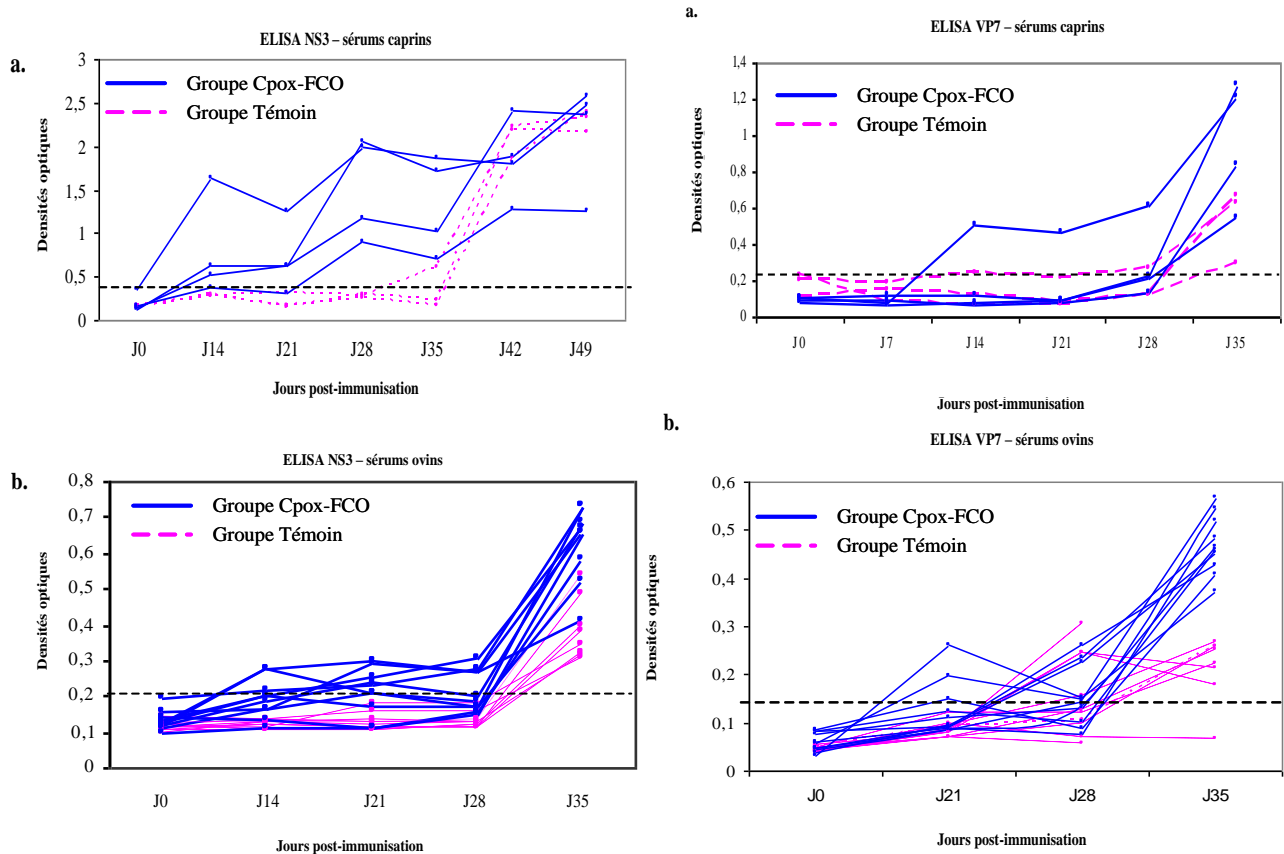


Figure 16 - Réponse anti-NS3 et VP7 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants.

a. Expérimentation chèvres, b. expérimentation moutons

Une séroconversion contre les antigènes NS3 et VP7 est observé à la fois chez les chèvres et chez les moutons avant épreuve, atténuée (chèvres) ou virulente (moutons). Une séroconversion dirigée contre les antigènes VP2 est également observée chez les moutons, une semaine avant épreuve. De plus, on observe un effet rappel, dû à l'épreuve, à J35, chez tous les animaux des groupes CpoX-FCO. Les animaux développent également des anticorps anti-capripoxvirus (groupes témoins et groupes CpoX-FCO). Ceci démontre la capacité de nos vaccins capripoxvirus exprimant différents gènes du virus de la FCO à générer des anticorps à la fois contre le vecteur mais aussi contre les transgènes. L'activation et la prolifération spécifiques des PBMCs caprins après restimulation avec les antigènes FCO et KS-1 entiers, inactivés, confirme l'immunogénicité des capripoxvirus recombinants FCO délivrés aux animaux (Perrin *et al.*, 2007).

- Evaluation de la protection

L'effet protecteur de nos vaccins capripoxvirus-FCO a été évalué chez les moutons après épreuve virulente. Seule, une protection partielle a été obtenue ; en effet certains animaux ayant reçu les constructions vaccinales capripoxvirus-FCO ont développé des signes cliniques et un animal est mort au cours de l'expérimentation.

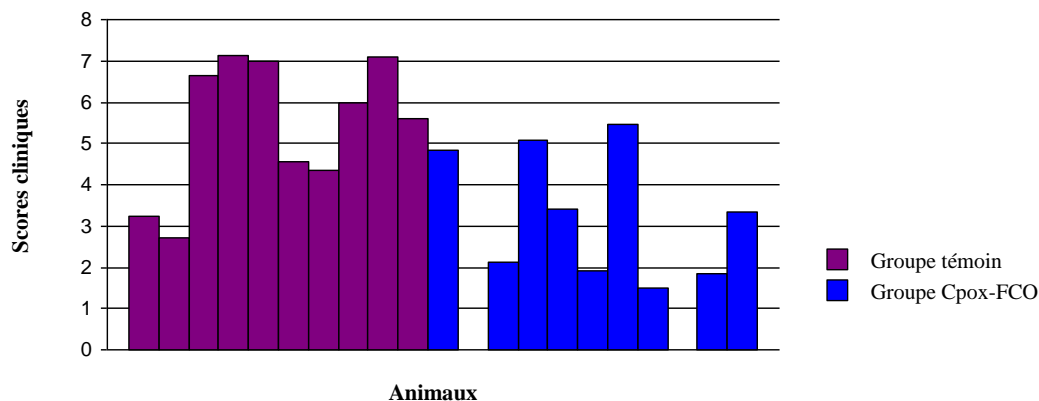


Figure 17 - Scores cliniques obtenus chez les moutons au cours des essais capripoxvirus recombinants

La figure 17 présente les scores cliniques attribués à chaque animal correspondant à la totalité des points obtenus, incluant la mortalité, au cours de l'expérimentation ramené au nombre de jours de clinique. Il apparaît une différence entre les deux groupes confortée par le test statistique de Kruskal-Wallis ($p < 0.005$). En effet, 2 animaux sur 11 du groupe Cpox-FCO ne présentent aucun signe clinique et 4 autres présentent des scores inférieurs à 3 points. En revanche, les animaux du groupe témoin ont des scores, pour la majorité (6/10) supérieurs à 5 points.

Les résultats présentés dans le sous-chapitre 4.3.4 ont fait l'objet de la publication suivante :

Perrin A., Albina E., Breard E., Sailleau C., Prome S., Grillet C., Kwiatek O., Russo P., Thierry R., Zientara S., **Cêtre-Sossah C.** Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*. 2007. 25(37-38):6774-83.

4.3.4.3. Conclusion

En conclusion de ce travail de thèse très largement initié et réalisé par Aurélie Perrin (thèse soutenue en Novembre 2007), et devant l'obtention d'une protection partielle de ces recombinants-FCO, de nouveaux essais ont été initiés avec une stratégie nouvelle consistant à co-exprimer les deux protéines de la capsid interne du virus de la FCO, VP3 et VP7. Ils seront détaillés dans le paragraphe 4.4 de ce manuscrit correspondant aux perspectives.

4.3.5 Contribution au développement d'un vaccin capripoxvirus recombinant protégeant contre la fièvre de la vallée du Rift et la Peste des petits Ruminants

4.3.5.1 Epidémiologie de la FVR et de la PPR

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift fut découvert en 1930 au Kenya dans la région du lac Naivasha. Jusqu'en 1975, la FVR fut considérée comme une maladie africaine, d'importance essentiellement vétérinaire (Figure 22). Elle provoquait des épizooties principalement chez les ovins en Afrique Orientale et Australe. L'homme n'était qu'un hôte accidentel et les cas humains rarement mortels. En 1975, un épisode épizootique et épidémique a eu lieu en Afrique du Sud. Par la suite, en 1976, le Soudan fut également touché. Mais c'est en 1977, en Egypte, que la FVR est devenue une préoccupation majeure de santé publique puisqu'elle a provoqué une épidémie avec plus de 600 cas humains mortels (Meegan, 1979). Des épidémies de FVR de forte ampleur se sont succédées en Afrique de l'Est, notamment au Kenya, en Afrique du Sud, au Zimbabwe, en Zambie et à Madagascar espacées de dix ans pour le Kenya en 1997-98 et en 2006-07 (Flick et Bouloy, 2005 ; Gerdes, 2002; Gerdes, 2004; Morrill et McClain, 1996 ; Peters et Linthicum, 1994). Dans les deux cas, ces épidémies se sont étendues en Somalie et en Tanzanie. Lors de l'épidémie de 1997-1998, le virus s'est propagé vers le Yémen et l'Arabie Saoudite qui, en 2000, subirent un grave épisode épizootique et épidémique avec une mortalité humaine, pour la première fois en dehors du continent africain. Le virus de la Fièvre de la vallée du Rift (VFVR) circule aussi en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Dès 1987 en Mauritanie, une épidémie a provoqué 200 cas humains mortels. Fin 2007, la FVR cause une grave épidémie au Soudan, 601 cas cliniques humains ont été rapportés dont 211 mortels, aucun cas clinique animal n'a été officiellement notifié. Plus récemment, en avril et mai 2008, Madagascar notifie, dans la région d'Antananarivo, un foyer de FVR touchant des bovins, et plusieurs dizaines de cas humains. En avril 2008, pour la première fois, l'île de Mayotte notifie des cas d'infection humaine et bovine de FVR autochtones.

Par ailleurs, la PPR est une maladie enzootique en Afrique subsaharienne, également présente au Moyen-orient et dans le Sud-Ouest Asiatique avec l'existence de 4 lignées différentes (Figure 22 bis). Le Maroc a été récemment touché en Août 2008, ainsi que le Nigéria et le Soudan (WAHID, 2008). La FVR et la PPR sévissent dans les mêmes régions, d'où notre projet d'élaborer une stratégie vaccinale commune à partir d'un capripoxvirus recombinant portant les 2 valences FVR et PPR.



Figure 22 : Distribution de la FVR
(Bird *et al.*, 2009)

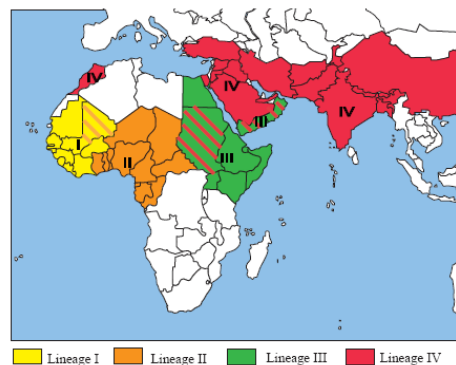


Figure 22bis : Distribution de la PPR (C.Minet, communication personnelle)

4.3.5.2 Le virus de la FVR et ses vaccins

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) appartient au genre *Phlebovirus* de la famille des *Bunyaviridae*. La plupart des virus de ce genre sont transmis par des phlébotomes, à l'exception du VFVR transmis par des moustiques et du virus Uukuniemi transmis par des tiques. Cette famille taxonomique comprend plus de 300 membres regroupés en cinq genres : *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, et *Tospovirus*. Comme tous les bunyavirus, le VFVR est un virus enveloppé, de plus de 120 nm de diamètre. Il possède un génome tri-segmenté composé d'ARN simple brin (Figure 23 et 24). Notre travail s'est basé sur le segment M qui comporte deux courtes glycoprotéines (G_N-ex-G₂ et G_C-ex-G₁) traversant en divers endroits l'enveloppe du virus, formée par une bicouche lipidique.

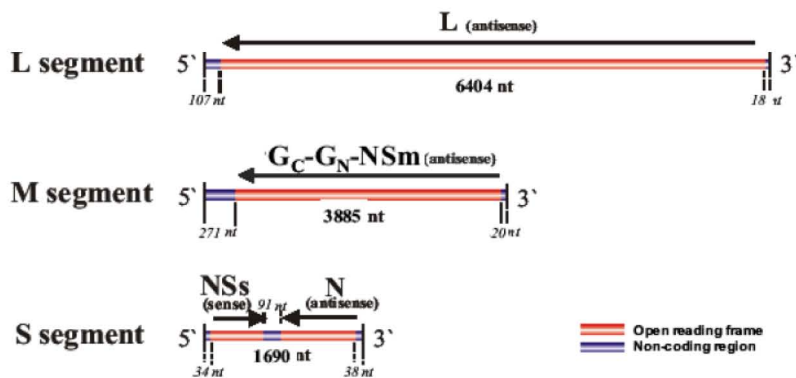


Figure 23 : Représentation schématique du génome FVR de la souche MP12 (Flick and Bouloy, 2005)

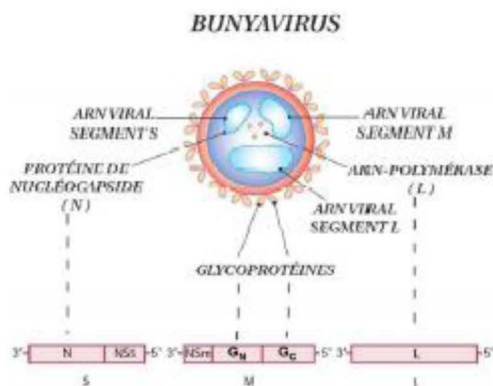


Figure 24 : Représentation de la capside des bunyavirus (Thiry, 2007)

Quatre épitopes neutralisants immunodominants ont été décrits sur le gène G2 (Keegan *et al.*, 1986; Schmaljohn *et al.*, 1989) indiquant le rôle immunoprotecteur de cette glycoprotéine, sur laquelle nous avons donc choisi de nous attarder.

Trois types de vaccins ont été développés ou sont à l'étude. Un **vaccin inactivé** à la β -propiolactone, à usage humain a été produit aux Etats-Unis et développé par Randall *et al.*, 1978, Geisbert et Jahrling, 2004). Son utilisation est restée expérimentale, pour les vétérinaires et les personnels des laboratoires à fort risque d'exposition au virus. Un **vaccin vivant atténué** a été produit à partir de la souche neurotrope *Smithburn*, développée par passage intra-cérébral de la souche virulente *Entebbe* chez des souris nouveau-nés et des

oeufs embryonnés (Smithburn, 1949) Toutefois, ce vaccin entraîne des effets tératogènes chez 15 % des brebis gestantes avec des anomalies du système nerveux central chez les foetus. D'autres souches virales atténuées ont été produites. L'une d'entre elles, *la souche MPI2*, obtenue par mutagenèse d'une souche virulente isolée en Egypte en 1977, semble être à l'origine un bon candidat vaccinal (Caplen, *et al.*, 1985) car elle présente des mutations dans chacun des trois segments du génome viral et pourrait être utilisée aussi bien chez les ruminants adultes que chez les jeunes animaux (Morrill et McClain, 1996). Toutefois, elle provoque des effets abortifs et tératogènes chez les brebis gestantes (Hunter *et al.*, 2002) et est neuro-virulente pour les singes inoculés par voie intracérébrale (Morrill et Peters, 2003). Un virus naturellement atténué, le *Clone 13*, possédant une large délétion dans NSs, à l'origine de son avirulence et rendant improbable toute réversion vers un phénotype virulent, est fortement immunogène pour la souris et le mouton et son inoculation est sans effet nocif chez la brebis gestante. Ce Clone 13 serait un bon candidat vaccin et son développement est en cours. Enfin, de nouvelles stratégies vaccinales sont à l'étude :

- *La manipulation des génomes des virus à ARN négatif* permet de générer des virions infectieux à partir de cDNAs clonés par génétique inverse (Bouloy *et al.*, 2009, Habjan *et al.*, 2008). Ces systèmes de génétique inverse ont révolutionné l'étude de l'expression des gènes viraux et ont permis de mieux comprendre le rôle des protéines de régulation durant les étapes de transcription/réplication et d'identifier les composants viraux interagissant avec la cellule hôte. Les avancées de génétique inverse devraient permettre de construire des virus modifiés, conduisant à de nouvelles perspectives pour produire des vaccins efficaces et sans danger (Bouloy *et al.*, 2009).

- Les gènes codant pour la nucléocapside ou les glycoprotéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée peuvent également être clonés dans un vecteur (bactérie, virus) tel que le système baculovirus très utilisé pour la production de structures protéiques reconstituant le virus (virus-like particles VLPs) (Näslund *et al.*, 2009 ; Habjan *et al.*, 2009). Le système des vaccins recombinants adénoviraux ou alphaviraux a également été très largement testé mais reste à l'état de recherche et n'est pas commercialisé (Holman *et al.*, 2009 ; Heise *et al.*, 2009). Des recombinants poxviraux ont également été très récemment construits à partir du virus de la vaccine (Collett *et al.*, 1987, Kakach *et al.*, 1988) ou de capripoxvirus (Wallace *et al.*, 2005 ; Wallace *et al.*, 2006).

- *La vaccination par ADN* est une stratégie qui a été abordée dans le cas de la FVR même si pour l'instant aucune protection totale n'a été observée chez la souris quand les ADN sont inoculés de façon unique (Lagerqvist *et al.*, 2009) ou de façon combinée avec des ADN d'autres virus tels que les Hantaan virus ou le virus de la fièvre hémorragique Crimée-Congo (Spik *et al.*, 2006).

La vaccination appliquée en début d'épizootie permet de réduire l'incidence de la maladie, mais les plans de contrôle sont malheureusement pris de vitesse par la propagation rapide de l'infection. L'acte de vaccination est cependant dangereux dans un foyer, car l'infection peut être facilement propagée par la réutilisation de la même aiguille chez plusieurs animaux.

4.3.5.3 Le virus de la PPR et ses vaccins

Le virus de la PPR est un virus enveloppé appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Morbillivirus*. Le génôme du virus de la PPR (X74443, Berhé *et al.*, 2005) est constitué d'un ARN monocaténaire négatif non segmenté codant pour six protéines de structure principales : N, P, M, H, F et L (Figure 25). L'association des 3 protéines N, P et L et de l'ARN génomique forme le complexe nucléoprotéique (RNP) agissant pour la transcription et réplication du génome viral.

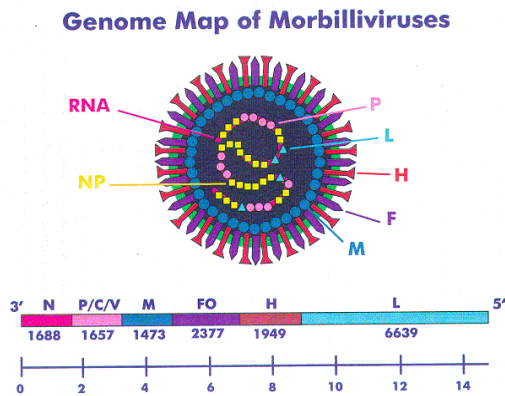


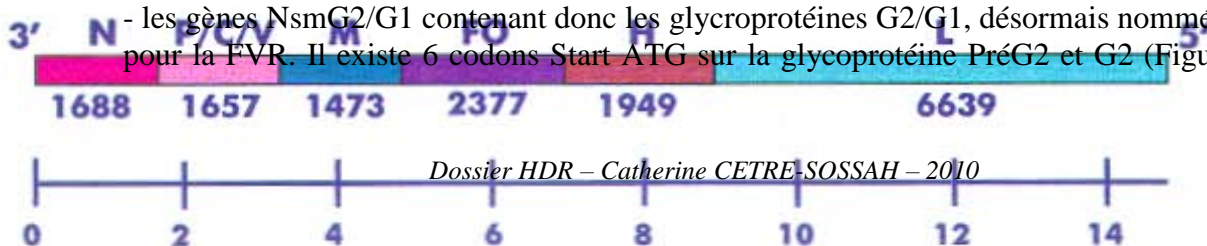
Figure 25 : Structure et organisation virale de la PPR

Au cours de sa multiplication, le virus emprunte l'enveloppe de la cellule hôte dans laquelle s'insère la protéine de la matrice M, la protéine de fusion F, responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte, et la protéine de l'hémagglutinine H, protéine d'attachement glycosylée, permettant la fixation du virus à la cellule hôte. Des vaccins efficaces et faciles à produire ont été développés pour lutter contre la PPR, il s'agit de souches virulentes, atténuées par passages successifs en culture cellulaire. Il existe plusieurs souches vaccinales, PPR Nig75/1 co-développée par le CIRAD et l'IAH de Pirbright (Diallo *et al.*, 1989) ou deux souches d'origine indienne (Singh RP *et al.*, 2009), toutes générant une immunité durable d'au moins 3 ans. En revanche, la différenciation entre un animal vacciné avec ce type de vaccin et un animal infecté n'est pas possible. Des vaccins capripoxviraux recombinants pour les 2 glycoprotéines de surface H et F ont été produits et ont montré leurs effets protecteurs avec des doses minimales protectrices aussi faibles que 10 doses et 0.1 dose TCID₅₀ respectivement (Diallo *et al.*, 2002, Berhé *et al.*, 2003). La suite de notre travail a donc porté sur la glycoprotéine H pour la construction de notre double recombinant FVR/PPR.

4.3.5.4 Construction d'un vaccin capripoxvirus double recombinant pour la FVR et la PPR

La construction d'un vaccin capripoxvirus double recombinant pour la FVR et la PPR et sa validation sont effectués sous ma direction par Madame Emna Fakhfakh, actuellement inscrite en troisième année de thèse, en cotutelle entre l'Université de Montpellier II et l'Université de Tunis-El Manar, à Tunis. L'objectif est la construction d'un vaccin double recombinant pour la FVR et la PPR, pathologies sévissant géographiquement dans les mêmes zones que les capripoxviroses (Afrique de l'Est (Tanzanie), Maghreb). Le but ultime est d'évaluer la capacité de notre vaccin à induire une réponse immunitaire spécifique et une protection chez les petits ruminants contre les 2 pathologies. Une enquête préliminaire de séroprévalence de ces 2 pathologies a été lancée en Tunisie, et a permis de conclure à un taux de séroprévalence nulle pour la FVR et de 13,6% pour la PPR sur les 601 et 482 prélèvements testés (Ayari-Fakhfakh *et al.*, 2009). Sachant que la clavelée et la variole caprine sont présentes en Tunisie, cette étude montre l'intérêt d'un vaccin portant plusieurs valences (capripoxvirus, PPR et FVR) si le risque d'introduction de la FVR et de la PPR augmentait dans les prochains mois. En ce qui concerne l'élaboration du vaccin capripoxvirus double recombinant FVR et PPR, le choix des gènes s'est porté en priorité sur :

- le gène de l'hémagglutinine H pour la PPR, et
- les gènes NsmG2/G1 contenant donc les glycoprotéines G2/G1, désormais nommées G_N/G_C pour la FVR. Il existe 6 codons Start ATG sur la glycoprotéine PréG2 et G2 (Figure 26-A).



Différents travaux ont mis en évidence un niveau d'expression protéique variant en fonction du codon Start ATG (Kakach *et al.*, 1988, Suzich *et al.*, 1990). La portion de G2 (Gc) choisie commence au troisième ATG, en position 174, comme indiqué en Figure 26/C5, puisque le niveau d'expression obtenu de G2 et G1 est équivalent (Kakach *et al.*, 1988).

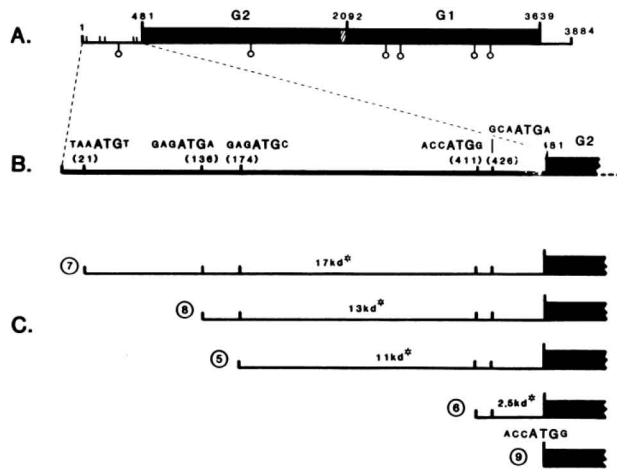


FIG. 1. RVFV M segment sequences present in recombinant vaccinia viruses. (A) Molecular organization of the RVFV M segment RNA. The numbers represent nucleotide coordinates of the M segment for the start of the mature glycoprotein coding sequences (nucleotides 481 to 2092 for G2 and G1, respectively) and the termination codon of the large ORF (nucleotide 3639). The closed bars indicate the glycoprotein-coding regions. The five in-phase ATGs preceding the start of the mature glycoprotein-coding sequences are denoted with vertical lines. Potential N-linked glycosylation sites (○) are also shown. (B) Expanded representation of the preglycoprotein region showing the position and context of the five potential initiation codons. (C) Schematic representation of the 5' M segment sequences present in the recombinant vaccinia viruses. The protein-coding potential (in kilodaltons [kd]) from the first available ATG to the beginning of the G2 coding sequences for each construct (*) is indicated.

Figure 26 : Positionnement des ATG sur préG2 et G2 (Figure 1 de Kakach *et al.*, 1988)

Les sites d'insertion dans le génôme sont respectivement pour la H-PPR, le gène codant pour un analogue de récepteur à la chimiokine de type R-IL8 (Le Goff *et al.*, 2009) et pour NSmG2-G1, la thymidine kinase. Ces deux gènes sont non essentiels à la réplication du virus. Les marqueurs de sélection utilisés sont le marqueur ecogpt (Romero *et al.*, 1993) et la GFP (Green Fluorescent Protein). Les promoteurs choisis sont le promoteur synthétique PS pour les gènes d'intérêt et l'équivalent capripoxvirus du promoteur pIL-1 décrit dans le génome du virus de la vaccine (Liu *et al.*, 2004) pour le gène de la GFP.

Les différentes étapes de construction de nos recombinants capripoxviraux :

1-Construction du plasmide navette utilisé lors de la recombinaison homologue avec le capripoxvirus pour chacun des 2 gènes (H-PPR et NSmG2G1-RVF)

Deux stratégies sont possibles et sont schématisées en Figure 27. Les plasmides comportent soit les parties flanquantes TKg et TKd soit RIL-8g et RIL8d présentes dans le génome du capripoxvirus, éléments clefs permettant la recombinaison, le gène de sélection Ecogpt sous promoteur synthétique PS et le gène marqueur positif GFP sous pIL1 et les gènes clonés dans le site de multiclonaage. L'obtention des constructions plasmidiques définitives est en cours, de nombreuses erreurs de séquence ayant été observées au cours des premières étapes de construction (délétions, recombinaisons aléatoires).

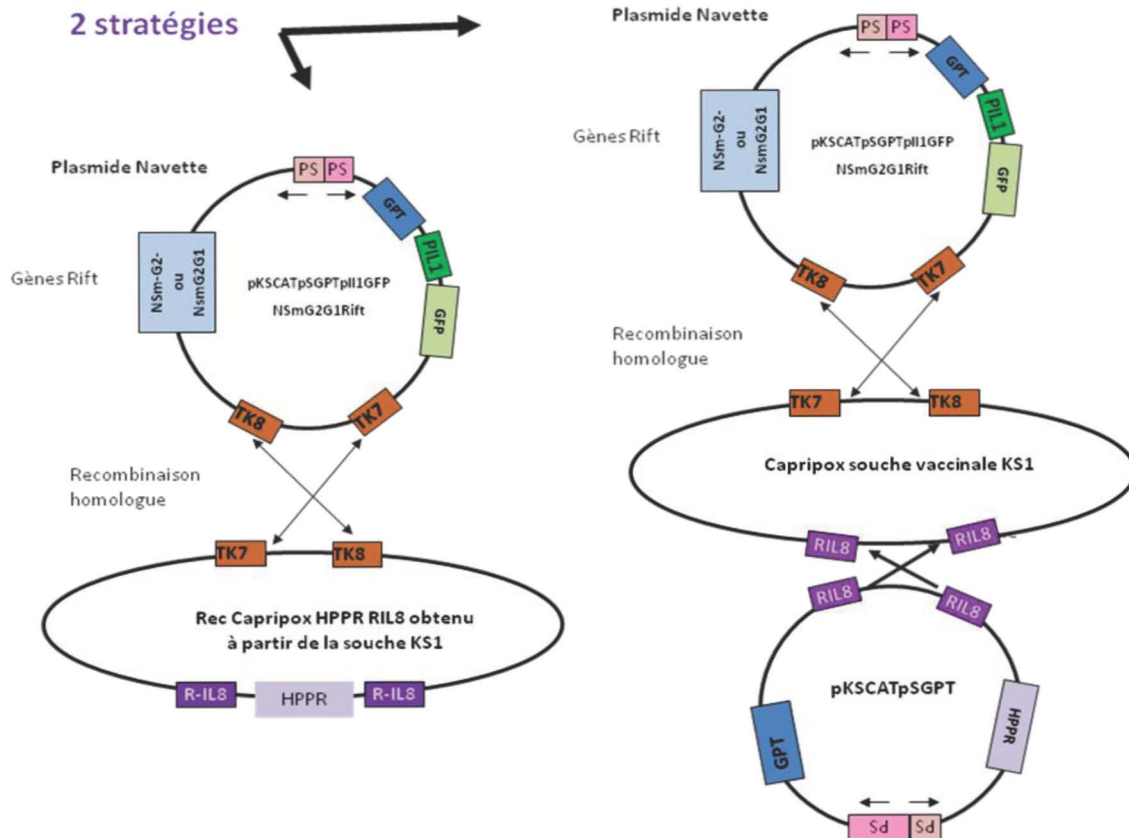
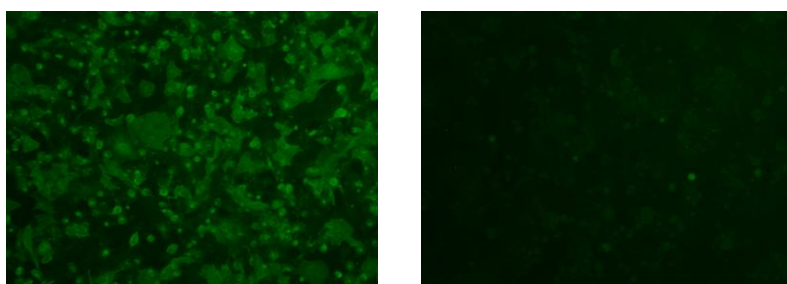


Figure 27 : Stratégies de recombinaison pour l'obtention du double recombinant RVF/PPR

2-Vérification de la fonctionnalité du plasmide par expression transitoire

La Figure 28 présente le témoin négatif (a) et le témoin positif (b) correspondant respectivement aux cellules OA3Ts non infectées et aux cellules transfectées avec un plasmide exprimant la «green fluorescent protein». Ces contrôles ont suivi le même protocole de fixation et de marquage que les échantillons. La figure 28 (c) présente le niveau d'expression du plasmide de transfert exprimant le gène de la VP7, pKSCATpSGPT-VP7, révélé par des anticorps monoclonaux spécifiques de G_N et G_c .



a.

b.

Figure 28 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines G2 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-NsmG2. Microscope optique à fluorescence x10

a- pKSCATpSGPT-NsmG2 après 48h d'incubation

b- témoin négatif

3-Evaluation de l'immunogénicité et de l'effet protecteur des constructions

L'immunogénicité des constructions et l'évaluation de leur pouvoir protecteur contre la FVR se feront dans un premier temps chez la souris, hôte sensible développant des signes cliniques classiques de FVR. L'avantage de cet hôte est que l'on pourra également analyser la réponse immunitaire de type cellulaire à partir des splénocytes restimulés *in vitro* (types cellulaires restimulés, et cytokines produites) et la réponse humorale. Une fois l'effet protecteur anti-RVF validé chez la souris, nous validerons l'effet protecteur anti-PPR et anti-capripox (avec des infections challenge) chez les petits ruminants (moutons). Ces expériences animales avec analyse des réponses immunitaires se feront avec des doses injectées variables, des voies d'inoculation spécifiques, dans des animaleries de confinement A3.

Les résultats présentés dans le sous-chapitre 4.3.5 ont fait l'objet des publications suivantes :

Ayari-Fakhfakh E., Ghram A., Bouattour A., Imen Larbi I., Latifa Gribâa-Dridi L., Kwiatek O. , Michèle Bouloy M., Geneviève Libeau G., Emmanuel Albina E., **C. Cêtre-Sossah**. First serological investigation of Peste des Petits Ruminants and Rift Valley Fever in Tunisia. The Veterinary Journal. **2009**. In press.

Cêtre-Sossah C., Albina E. Rift Valley Fever: veterinarian aspects and impact for human health. Med Trop (Mars). **2009**. 69(4):358-61.

Cêtre-Sossah C., Billecocq A., Lancelot R., Defernez C., Favre J., Bouloy M., Martinez D., Albina E. Evaluation of a commercial competitive ELISA for the detection of antibodies to Rift Valley fever virus in sera of domestic ruminants in France. Prev Vet Med. **2009**. 90(1-2):146-9.

4.4 Perspectives

L'approche des vaccins capripoxviraux recombinants (Chapitre 4.3), devrait conduire à des résultats originaux tels que

- (i) l'élaboration d'un vaccin capripoxvirus recombinant contre la FCO, par le biais de la production d'une pseudo-particule VP3-VP7, protecteur contre tous les sérotypes.
- (ii) l'élaboration du premier vaccin capripoxvirus double recombinant dans 2 sites d'insertion différents (TK et RIL8) protecteur contre la FVR et la PPR, maladies ayant de fortes conséquences économiques avec un impact en santé humaine non négligeable pour la FVR.

(i) *l'élaboration d'un vaccin capripoxvirus recombinant contre la FCO*

Les résultats présentés montrent une protection partielle contre la FCO induite par des constructions vaccinales élaborées à base de capripoxvirus recombinants pour la VP2, VP7, NS1 et NS3. Des études récentes ont montré la capacité de vecteurs canarypoxvirus, co-exprimant les deux protéines de la capsid externe du BTV, VP2 et VP5, à générer une protection totale chez les moutons après une épreuve virulente de type homologue (Boone *et al.*, 2007). L'intérêt de ces approches est la reconstitution d'une pseudo-particule virale, non spécifique du sérotype, supposée plus immunogène que les protéines individuelles. Son immunogénicité pourra être évaluée dans une stratégie vaccinale de type hétérologue. Un certain nombre d'autres éléments pourrait améliorer l'immunogénicité et/ou la protection, tels que l'adjonction d'adjuvants (Bublot *et al.*, 2006), l'insertion de différents promoteurs (précoces/tardifs) ou d'immunomodulateurs tels que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou le facteur de croissance hématopoïétique, Flt3L, capable d'inciter au recrutement des cellules dendritiques et à la réponse cellulaire en augmentant la réponse immunitaire de type CD4 + (Mwangi *et al.*, 2002), la dose d'antigènes (Janeway *et al.*, 2003) et la voie d'immunisation (voie ID, IM, SC, orale (Kent *et al.*, 2005)). La construction d'un plasmide de transfert comportant les gènes VP3 et VP7 a été réalisée en respectant le ratio 6 : 1 (VP7 : VP3) décrit dans le virus (Huisman & Vanderschuer, 1990) à l'aide du promoteur pIL-1, un analogue du promoteur IIL du virus de la vaccine (Liu *et al.*, 2004) qui semble avoir une capacité d'expression nettement plus élevée que les autres promoteurs utilisés classiquement (pS, p7.5, ATI) (Figure 18).

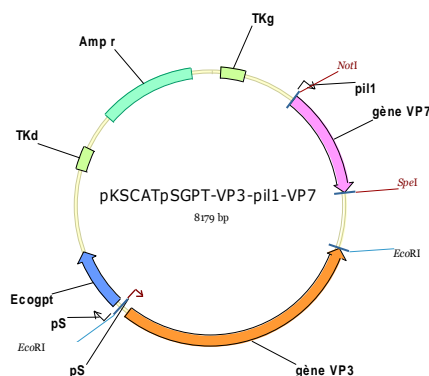


Figure 18 - Carte de restriction du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP3-pil1-VP7

La validation de l'expression transitoire du gène VP7 s'est faite par Immunofluorescence (Figure 19) et celle du gène VP3 par RT-PCR à partir de l'ARNm. Une amplification spécifique a été obtenue dans les ADNc¹ pour chacun de ces deux gènes alors qu'aucune amplification n'est obtenue pour les ARNm initiaux. Ce résultat permet de valider l'expression *in vitro* du double recombinant (Figure 19bis).

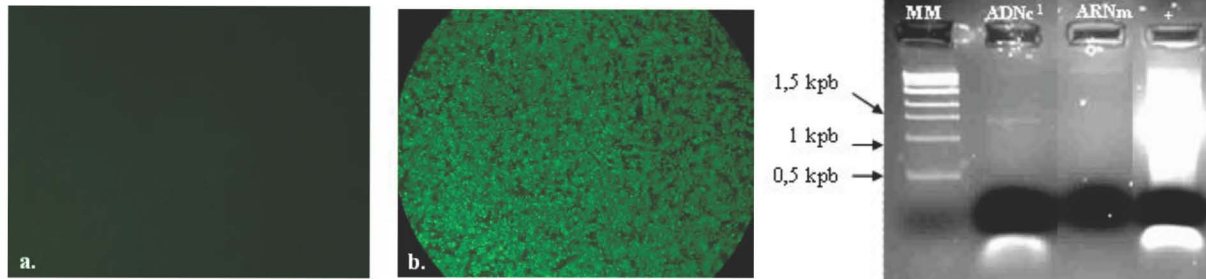


Figure 19 - Détection par IF de l'expression des protéines VP7 par des cellules OA3TS transfectées avec le Capripoxvirus double recombinant

Figure 19bis - Expression de l'ARNm lors de l'expression *in vitro* du double recombinant

- a. cellules témoins,
- b. cellules transfectées avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pil1-VP7.

Une importante expression de la protéine VP7 a pu également être visualisée sous forme de masses denses grises avec un marquage spécifique (ponctuations noires) présent dans tout le cytoplasme des cellules infectées (Figure 20). Sur une coupe de cellules transfectées avec le double recombinant, il a été observé une structure particulière composée d'un ensemble de structures similaires à des microtubules (flèche) et des assemblages linéaires (Figure 21). Il pourrait s'agir de pseudo particules virales du virus de la FCO.

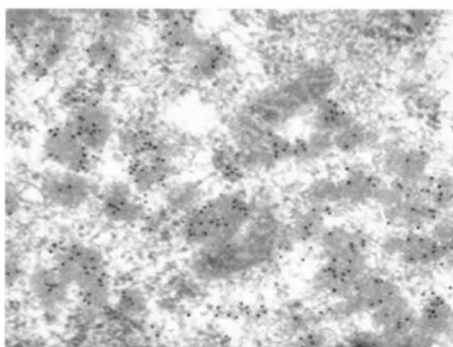


Figure 20 - Observation au MET d'un immunomarquage de la protéine VP7, après transfection de cellules OA3Ts avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pil1-VP7.

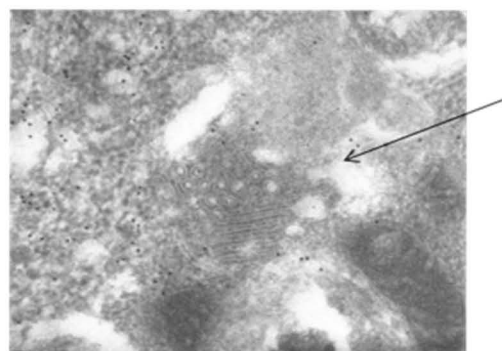


Figure 21 - Observation en MET de possibles pseudo particules virales du virus de la FCO

L'observation d'une seule structure pouvant évoquer une capside virale ne permet pas de conclure quant à la reconstitution d'une pseudo particule virale VP3-VP7 dans les cellules transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP3-pil1-VP7. Il semble que le niveau d'expression de la protéine VP3 soit insuffisant, ainsi 2 nouvelles constructions des gènes VP3 et VP7, chacune sous le promoteur pIL1 sont envisagées et seront testées en cotransfection pour observation en microscopie électronique.

Une fois, le bon ratio VP3 :VP7 identifié, les virus recombinants respectifs seront construits et évalués en terme d'immunogénicité- Il est également envisagé d'associer à ces constructions les épitopes immunodominants de la protéine VP2 pour quelques sérotypes européens (sérotypes 1, 2, 4 et 8).

Les étapes suivantes sont donc :

- L'évaluation de l'immunogénicité et de l'effet protecteur de ces virus recombinants purifiés par des expérimentations animales sur espèces d'intérêt : les caprins et les ovins ce qui permettra l'analyse de la réponse immunitaire de type humorale et de type cellulaire) et l'évaluation de l'effet protecteur par la présence/absence de signes cliniques après épreuve virulente (sérotypes 1, 2, 4 et 8-FCO).
- Etude de la loi Dose/Effet des constructions induisant la protection
- Elimination du marqueur de sélection (GPT) présent dans les constructions, afin de pouvoir industrialiser la production tout en respectant les lois éthiques
- Etude de la durée d'immunité

(ii) *l'élaboration du premier vaccin capripoxvirus double recombinant dans 2 sites d'insertion différents (TK et RIL8) protecteur contre la FVR et la PPR*

Les premières constructions vaccinales protégeant à la fois contre la PPR et la FVR à base de capripoxvirus double recombinant dans 2 sites d'insertion différents (TK et RIL8) une fois produites en quantité suffisante et à un niveau de purification satisfaisant devront subir plusieurs évaluations :

- évaluation de l'immunogénicité
- évaluation de l'effet protecteur

Ces évaluations se feront dans un premier temps chez la souris, hôte sensible développant des signes cliniques classiques de FVR. L'avantage de cet hôte est que l'on pourra également analyser la réponse immunitaire de type cellulaire à partir des splénocytes restimulés *in vitro* (types cellulaires restimulés, et cytokines produites) ainsi que la réponse humorale (isotypes d'anticorps produits).

Une fois l'effet protecteur anti-FVR validé chez la souris, nous validerons différents aspects :

- l'effet protecteur anti-PPR et anti-capripox chez les petits ruminants (moutons) avec des épreuves infectieuses par chacun des virus à des doses suffisantes pour engendrer des signes cliniques caractéristiques dans les groupes contrôle. La virémie, la cinétique des anticorps produits anti-Capripox, anti- PPR et anti-FVR seront suivis.
- l'exploration de la protection dépendant des voies d'inoculation (sous-cutanée, intradermique, intraveineuse) sera évaluée
- l'évaluation de la loi dose/effet et de la durée d'immunité seront également réalisées. Toutes ces expériences se feront, bien entendu, dans des animaleries de confinement A3 puisque les 2 virus d'épreuve infectieuse que sont la PPR et la FVR sont des agents de classe 3.

4.5 Conclusion générale

Les différentes parties développées dans ce chapitre 4 m'ont permis d'étudier différents patho-systèmes : *Schistosoma mansoni*, le virus de la fièvre catarrhale ovine et ses vecteurs que sont les *Culicoides*, le virus de la fièvre de la vallée du rift. J'ai pu également aborder l'élaboration de constructions vaccinales en utilisant les vecteurs viraux capripoxvirus pour l'expression de différents transgènes.

Les travaux engagés sur la détection moléculaire des espèces de *Culicoides* du groupe *Obsoletus* par la thèse de Bruno Mathieu (Chapitre 4.2) trouve tout leur intérêt dans l'actualité de l'émergence de la FCO sur le continent français en 2006, la maladie étant présente en Corse depuis 2000. La présence en Corse du vecteur *C. imicola* est avérée ce qui n'est pas le cas en France continentale où ce vecteur n'a jamais été identifié dans aucune des régions touchées depuis le début de l'épizootie. Il s'agirait plus volontiers d'une ou de plusieurs des espèces du groupe *Obsoletus*, ce qui justifie la recherche des biotopes larvaires de ces espèces appartenant au sous-genre *Avaritia*, ce qui pourrait permettre la mise en élevage d'une ou de plusieurs de ces espèces. Il n'existe aucun élevage actuellement dans le monde entier, ce qui limite les études de compétence vectorielle de différentes espèces avec différents sérotypes sévissant en Europe. D'autre part, le développement d'outils moléculaires de type PCR multiplexe avec en parallèle une clef d'identification par microscopie (incluant différents critères morphologiques de différenciation entre espèces) pour le sous-genre *Avaritia* paraît crucial et fait partie intégrante de la thèse de Bruno Mathieu.

Un certain nombre de partenariats ont pu être développés avec nos collègues européens que sont les espagnols, italiens, allemands, belges et hollandais, mais également nos collègues d'Afrique du Sud par l'obtention de projets européens tels que MEDREONET (<http://medreonet.cirad.fr>) projets qui permettent de mettre en place un réseau avec l'objectif par exemple d'harmoniser les différentes techniques (captures par pièges, quantification de virus, stratégie vaccinale) que chacun de nos pays doit affronter en temps de crise sanitaire.

L'approche des vaccins capripoxviraux recombinants (Chapitre 4.3), devrait conduire à des résultats originaux tels que

- l'élaboration d'un vaccin capripoxvirus recombinant contre la FCO par le biais de la production d'une pseudo-particule VP3-VP7 protecteur contre tous les sérotypes.
- l'élaboration du premier vaccin capripoxvirus double recombinant dans 2 sites d'insertion différents (TK et RIL8) protecteur contre la FVR et la PPR, maladies ayant de fortes conséquences économiques avec un impact en santé humaine très important pour la FVR.

Les différents projets présentés dans ce manuscrit ont été et sont réalisés en collaboration avec l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication (EID), Montpellier, la Faculté de Médecine de Strasbourg (Dr Jean-Claude Delécolle, Bruno Mathieu), le laboratoire d'études et de recherches des ruminants, AFSSA Sophia-Antipolis (Dr Richard Thiéry et Mr Guibert), l'UMR Afssa/INRA/ENVA 1161 Virologie, Maisons-Alfort (Dr Stéphane Zientara, Dr Emmanuel Bréard, Corinne Sailleau), Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur de Paris (Dr Michèle Bouloy), l'UMR/INRA/ENV 1225, Toulouse (Dr Stéphane Bertagnoli), le laboratoire de microbiologie et entomologie de l'Institut Pasteur de Tunis, Tunisie (Dr Ghram et Dr Bouattour). La collaboration avec l'Institut Pasteur, l'Université de Tunis s'est renforcée grâce à une bourse européenne Averroes de la communauté européenne qui finance un accueil de 18 mois (Mi-2009-2010) de Mme Emna Fakhfakh dans notre laboratoire. Le projet concernant l'étude des capripoxvirus recombinants

contre la FCO a été soutenu par un co-financement d'une bourse de thèse pour Melle Aurélie Perrin de 3 années par le CIRAD et la Région Languedoc-Roussillon. La suite de ces derniers travaux est financée par un projet européen ORBIVAC qui va débiter très prochainement.

Mes premiers pas de jeune chercheur dans le monde de la santé humaine, des parasites et du milieu tropical sont bien loin. Mon intégration au sein de ce monde de l'animal et des maladies virales et vectorielles en pleine émergence s'est plutôt bien passée, et j'espère mener à terme différents types de constructions vaccinales contre les pathologies qui m'intéressent désormais avec des approches nouvelles qui ont déjà évolué et qui continueront d'évoluer.

Le contexte dans lequel se déroule ma réflexion sur la formation et l'encadrement de la recherche est en grand bouleversement : autonomie et indépendance des Universités, la fusion d'équipes inter-Institutions de Recherche en UMR (Unité Mixte de Recherche), la demande de financement croissante aux bailleurs de fonds, le métier de chercheur évolue de jour en jour. J'ai cependant choisi d'intégrer le CIRAD, pour son mandat de développement des pays du Sud. Ce développement passe entre autres par l'organisation d'ateliers de formation, de courte durée, mais également par la prise en charge d'étudiants en seconde année de master ou en thèse, qui sauront, une fois formés, encadrer à leur tour, d'autres étudiants motivés sur place et animer aux-mêmes leurs propres équipes de recherches. Là est une grande partie de ma motivation de jeune chercheur actuellement. Les financements de thèse de troisième cycle ne sont pas toujours faciles à obtenir mais peuvent de plus en plus être financés par l'Union Européenne sous forme de projets ou par les Services de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) des pays concernés. La formation de thésards est indispensable pour les pays du Sud pour permettre et inciter à une autonomie à conduire leurs projets de recherche propres et à répondre aux appels d'offres internationaux. C'est en tout cas mon souhait le plus profond et pour développer les moyens pour atteindre cet objectif, l'obtention d'une habilitation à diriger des recherches est un des prérequis.

4.6 Références Bibliographiques

- Albina E., Zientara S., Sailleau C., Perrin A., Cêtre-Sossah C., Bréard E., Grillet E.** La fièvre catarrhale ovine (bluetongue): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*, 2007, 11:63-74.
- Andrew M.E., Coupar B.E.** Biological effects of recombinant vaccinia virus-expressed interleukin 4. *Cytokine*, **1993**, 4(4):281-6.
- Andrew M., Whiteley P., Janardhana V., Lobato Z., Gould A., Coupar B.** Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, **1995**, 47(3-4):311-322.
- Ayari-Fakhfakh E., Ghram A., Bouattour A., Imen Larbi I., Latifa Gribâa-Dridi L., Kwiatek O., Bouloy M., Libeau G., Albina E., C. Cêtre-Sossah.** First serological investigation of Peste des Petits Ruminants and Rift Valley Fever in Tunisia. *The Veterinary Journal*. **2009**. In press.
- Bansal O.B., Stokes A., Bansal A., Bishop D., Roy P.** Membrane organization of bluetongue virus non-structural glycoprotein NS3. *Journal of virology*, **1998**, 72(4):3362-9.
- Barber T.L.** Temporal appearance, geographic distribution and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. *American journal of veterinary research*, **1979**, 40:1654-1656.
- Beckenbach A.T., Borkent A.** Molecular analysis of the biting midges (Diptera: ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxydase subunit 2. *Molecular phylogenetics and evolution*, **2003**, 27:21-35.
- Berhé G., Minet C., Le Goff C., Barrett T., Ngangnou A., Grillet C., Libeau G., Fleming M., Black D.N., Diallo A.** Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *Journal of virology*, **2003**, 77(2):1571-7.
- Berhe,G., Yami,M., Minet,C., Libeau,G., Haffar,A., Meyer,G., Caufour,P., Albina,E. and Diallo,A.** Full genome sequence of Peste des Petits Ruminants virus, vaccine strain Nigeria 75/1. GenBank accession Number X74443, **2005**.
- Bertagnoli S.** Poxvirus. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 407-484.
- Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ.** Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc.*, **2009**, 234 (7): 883-93.
- Blackburn N.K., Searle L., Phelps R.J.** Viruses isolated from *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) caught at the Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. *Journal of entomological society of South Africa*, **1985**, 48:331-36.
- Blancou J., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Pastoret P.P., Soulehot J.P., Desmettre P.** Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, **1986**, 322:373-375.
- Boone J.D., Balasuriya U.B., Karaca K., Audonnet J.C., Yao J., He L., Nordgren R., Monaco F., Savini G., Gardner I.A., Maclachlan N.J.** Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine*, **2007**, 8; 25(4):672-8.
- Boorman J.** Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes. *The veterinary record*, **1986**, 118:21.
- Boorman J.** *Culicoides* of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna Saudi Arabia*, **1989**, 160-224.
- Borden E.C., Shope R.E., Murphy F.A.** Physicochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus – a new taxonomy group. Physicochemical and serological studies. *Journal of general virology*, **1971**, 13, 261-271.
- Bouloy M, Flick R.** Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Research*, **2009**, 84 (2):101-18
- Boyle D.B., Coupar A.E.H., Both G.W.** Multiple-cloning-site plasmids for the rapid construction of recombinant poxviruses. *Gene*, **1985**; 35(1-2):169-177.
- Boyle D.B., Coupar A.E.H.** A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene*, **1988**; 65:123-128.
- Braverman Y., Boorman J., Kremer M.** Faunistic list of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Israel. *Les cahiers de l'ORSTOM*, **1976**, 14:179-185.

Brochier B., Languet B., Blancou J., Thomas I., Kieny M.P., Costy F., Desmetre P., Pastoret P.P. Use of recombinant vaccinia rabies virus for oral vaccination of wildlife against rabies. *Journal of wildlife diseases*, **1989**, 25:540.

Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Baudouin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmetre P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P. Large scale eradication of rabies with a recombinant vaccinia-rabies virus. *Nature*, **1991**, 354:520-522.

Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Baudouin B., Lecocq J.P., Languet B., Mosselmans F., Beier R., Lecomte L., Mullier P., Roland H., Kervyn T., Renders C., Escutenaires S., Pastoret P.P. Elimination de la rage en Belgique par la vaccination du renard roux (*Vulpes*). *Annales de médecine vétérinaire*, **2001**, 145:293-305.

Brookes S.M., Hyatt A.D., Eaton B.T. Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *Journal of General Virology*, **1993**, 74:525-30

Bublot M., Pritchard N., Swayne D.E., Selleck P., Karaca K., Suarez D.L., Audonnet J.C., Mickle T.R. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2006**, 1081:193-201.

Buller R.M.L., Palumbo G.J. Poxviruses pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, **1991**, 55(1): 80-122.

Campbell C.H. Immunogenicity of bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Vaccine*, **1985**, 3, 401.

Caplen H, Peters CJ, Bishop DH . Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J Gen Virol.*, **1985**, 66 (Pt 10):2271-7.

Capron M, Nogueira-Queiroz JA, Papin JP, Capron A. Interactions between eosinophils and antibodies: in vivo protective role against rat schistosomiasis. *Cell Immunology*, **1984**, 83(1):60-72.

Capron A, Dessaint JP, Capron M, Ouma JH, Butterworth AE. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science*, **1987**, 238(4830):1065-72. Review.

Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabrò A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale

M., Mellor P.S. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *The Veterinary Record*, **2003**, 19; 153(3):71-4.

Carroll M.W., Moss B. E. *Coli* beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, **1995**, 19, 352-354.

Cêtre C., Cocude C., Pierrot C., Godin C., Capron, A., M. Capron and J. Khalife. *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. **1998**. 20:135-142.

Cêtre C., Pierrot C., Cocude C., Lafitte S., Capron A, Capron M. and J. Khalife. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. *Infection and Immunity*. **1999**. 67: 2713-2719

Cêtre C., Pierrot C., Maire E., Lafitte S., Capron A, Capron M. and J. Khalife. Interleukin-13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *European Cytokine Network*. **2000a**. 11 :241-250.

Khalife J., Cêtre C., Pierrot C. and M. Capron. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. *Parasitology international*. **2000b**. 49:339-345.

Cêtre-Sossah C., Baldet T., Delécolle J.C., Mathieu B., Perrin A., Grillet C., Albina E. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **2004**, 35(3):325-37.

Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci*. **2008**. 85(2):372-82.

Chakrabarti S., Brechling K., Moss B. Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Molecular and cellular biology*, **1985**, 5:3403-3409.

Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today*, **1994**, 15(12):575-81. Review.

- Cioli D., Blum K., Ruppel A.** *Schistosoma mansoni*: relationship between parasite age and time of spontaneous elimination from the rat. *Exp Parasitol.* **1978** Jun;45(1):74-80.
- Clavijo A., Sepulveda L., Riva J.** Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *The veterinary record*, **2002**, 7:301-302.
- Collett M., Keegan K., Hu SL, Sridhar P., Purchio AF, Ennis WH and Dalrymple JM.** Protective subunit immunogens to Rift Valley Fever virus from bacteria and recombinant vaccinia virus. *The Biology of negative strand viruses*, **1987**, Chapter 43, pp. 321-329.
- Collier L.H.** The development of a stable Smallpox vaccine. *The journal of hygiene*, **1955**, 53:76-101.
- Cowley J.A., Gorman B.M.** Cross-neutralisation of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Veterinary microbiology*, **1989**, 19, 37-51.
- Dallas J.F., Cruickshank R.H., Linton Y.M., Nolan D.V., Patakakis M., Braverman Y., Capela R., Capela M., Pena I., Meiswinkel R., Ortega M.D., Baylis M., Mellor P.S., Mordue Luntz A.J.** Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Medical and veterinary entomology*, **2003**, 17(4):379-87.
- Daniels P.W., Sendow I., Soleha E., Sukarsih E., Hunt N.T., Bahri S.** Australian-Indonesian collaboration in veterinary arbovirology - a review. *Veterinary microbiology*, **1995**, 46:151-174.
- Davies F.G.** Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goat in Kenya with observations on the epidemiology and control. *The Journal of hygiene*, **1976**, 76:163-171.
- Delécolle J.C.** Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. *Thèse d'Etat*, Université Louis Pasteur, **1985**, 239 p.
- Delécolle J.C., Schaffner F.** Vecteurs des arboviroses, *Culicoides*. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, 123-138.
- De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Scaramozzino P., Amaddeo D., Cardeti G., Scicluna M., Ferrari G., Autorino G.L.** Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *The veterinary record*. **2005**, 156(10):301-4.
- Diallo A., Taylor WP., Lefèvre P.C., Provost A.** Atténuation d'une souche virulente de PPR: candidat pour un vaccin homologue vivant, *Revue Elev. Méd Trop. Vét. Trop*, 1989, 42 (3), 311-319.
- Diallo A., Minet C., Berhé G., Le Goff C., Black D.N., Fleming M., Barrett T., Grillet C., Libeau G.** Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2002**, 969:88-91.
- Dijkstra E, van der Ven IJ, Meiswinkel R, Hölzel DR, Van Rijn PA, Meiswinkel R.** *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record*, **2008**, 162(13):422.
- Dominguez J., Lorenzo M.M., Blasco R.** Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, **1998**, 220, 115-121.
- Dubbs D.R., Kits S.** Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in TK inducing activity. *Virology*, **1964**; 22:214-225.
- Dulac G.C., Duboc C., Meyers D.J., Taylor E.A., Ward D., Sterritt W.G.** Incursion of bluetongue virus type 11 and epizootic hemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagen Valley. *Canadian Veterinary Medical Association*, **1989**, 30:351-354.
- Dulac G.C., Sterritt W.G., Dubuc C., Afshar A., Myers E.A.** Incursions of orbiviruses in Canada and their serologic monitoring in the native animal population between 1962 and 1991. In: Walton and Osburn eds., **1992**, pp. 120-127.
- Du Toit R.M.** The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **1944**, 19, 7-16.
- Erasmus B.B.** The history of bluetongue. In: Barber T.L., Jochim M.M., *Bluetongue and related Orbiviruses*, eds. Progress in clinical and biological research. Vol.178. New York: Alar R. Liss, **1985**, 7-12.
- FAO**, Santé animale, Fiche maladies, Bluetongue - Vectors and Intermediate Hosts.

<http://www.fao.org/AG/AGAINFO/subjects/fr/health/diseases-cards/bluetongue.html>

Falkner F.G., Moss B. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *Journal of virology*. **1988**, 62, 1849-1854.

Fassi-Fehri M., Lefèvre P.C. Clavelée et variole caprine. In : Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 415-427.

Fauquet C.M. Virus taxonomy. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, Editors, *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, **2005**, pp 328-347.

Flick R., Bouloy M. Rift Valley fever virus. *Curr Mol Med.*, **2005**, 5(8):827-34

Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Molecular and cellular biology*, **1985**, 5, 1918-1924.

French T.J., Marshall J.J., Roy P. Assembly of double-shelled, virus like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *Journal of Virology*, **1990**, 64(12):5695-700.

French T.J., Roy P. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *Journal of Virology*, **1990**, 64(4): 1530-1536.

Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, Cêtre-Sossa CB, Andove J, Hightower AW, Karanja DM, Colley DG, Secor WE. Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans. *Infect Immunity*, **2006**, 74(4):2169-76.

Geisbert T.W. and Jahrling P.B. Exotic emerging disease: Progress and challenges. *Nature medicine*, **2004**, 10, (12 SUPPL).

Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J.R., Caccone, A. Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status, *Genetics*, **2002**, 161, 1561-1578

Gerdes G.H. Rift valley fever. The veterinary clinics of North America. *Food animal practice*, **2002**, 18, (3): 549-555.

Gerdes G.H. Rift valley fever. *OIE Revue Scientifique et Technique*, **2004**, 23 (2) : 613-623.

Gerry A.C., Mullens B.A. Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy, with reference to potential bluetongue virus transmission and persistence. *Journal of Medical Entomology*, **2000**, 37(5):675-88.

Gibbs E.P.J., Greiner E.C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. The arboviruses: epidemiology and ecology. Volume II, **1988**, 39-70.

Gibbs E.P.J., Greiner E.C. The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases*, **1994**, 17:207-220.

Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslac J.P., Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, **1990**, 179:247-266.

Gomulski L.M., Meiswinkel R., Delécolle J.C., Goffredo M., Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **2006**, 20(2):229-38.

Gouet P., Diprose J.M., Grimes J.M., Malby R., Burroughs J.N., Zientara S., Stuart D.I., Mertens P.P. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cells*, **1999**, 14; 97(4):481-90.

Greiner E.C., Barber T.C., Pearson J.E., Kramer W.L., Gibbs E.P.J. Orbiviruses from *Culicoides* in Florida. In: Barber T.L., Jochim M.M., eds. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York: Liss. **1985**, pp. 195-200.

Greiner E.C., Knausenberger W.I., Messersmith M., Kramer W.L., Gibbs E.P. *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) associated with cattle in St. Croix, Virgin Islands, and their relevance to bluetongue virus. *Journal of medical entomology*, **1990**, 27(6):1071-3.

Grimes J.M., Burroughs J.N., Gouet P., Diprose J.M., Malby R., Zientara S., Mertens P.P., Stuart D.I. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature*, **1998** 1; 395(6701):470-8.

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol.*, **1991**, 146 (4):1322-7.

Gumm I.D., Newman J.F. The preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. *Archives of Virology*, **1982**; 72(1-2):83-93.

Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F. T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J Gen Virol.* , 2008, 89(Pt 9):2157-66.

Habjan M, Penski N, Wagner V, Spiegel M, Overby AK, Kochs G, Huiskonen JT, Weber F. Efficient production of Rift Valley fever virus-like particles: The antiviral protein MxA can inhibit primary transcription of bunyaviruses. *Virology*, **2009**, 385(2):400-8.

Hansen S.G., Cope T.A, Hruby D.E. Bizyme: a novel fusion protein-mediating selection of vaccinia virus recombinants by fluorescence and antibiotic resistance. *Biotechniques*. **2002**, 32(5):1178-1180.

Hardy J.L., Houk E.J., Kramer L.D.R., Reeves W.C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*, **1983**, 281, 22-262.

Heise MT, Whitmore A, Thompson J, Parsons M, Grobbelaar AA, Kemp A, Paweska JT, Madric K, White LJ, Swanepoel R, Burt FJ. An alphavirus replicon-derived candidate vaccine against Rift Valley fever virus. *Epidemiol Infect.*, 2009, 137(9):1309-18.

Hewat E.A., Booth T.F., Roy P. Structure of bluetongue virus particles by cryo electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **1992a**, 108, 35-48.

Hewat E.A., Booth T.F., Wade R.H., Roy P. 3-D reconstruction of bluetongue virus tubules using cryoelectron microscopy. *Journal of structural biology*. **1992b**, 108(1):35-48.

Homan E.J., Mo C.L., Thompson L.H., Barreto C.H., Oviedo M.T. Epidemiologic study of bluetongue viruses in Central America and the Caribbean. *American journal of veterinary research*, **1990**, 51:1089-1094.

Holman DH, Penn-Nicholson A, Wang D, Woraratanadharm J, Harr MK, Luo M, Maher EM, Holbrook MR, Dong JY. A Complex

Adenovirus Vectored Vaccine Against Rift Valley Fever Virus Protects Mice Against Lethal Infection in the Presence of Pre-existing Vector Immunity. *Clin Vaccine Immunol.*, **2009**, Sep 23. [Epub ahead of print]

Howell P.G. A preliminary antigenic classification for strains of bluetongue virus. *Onderstepoort journal of veterinary research*, **1960**, 28(36):357-363.

Howell P.G. The antigenic classification and distribution of naturally occurring strains of bluetongue virus. *Journal of South African veterinary medicine association*, **1970**, 41(3):215-223.

Huismans H., Els H.J. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*, **1979**, 30; 92(2):397-406.

Huismans H., Van Der Walt N.T., Cloete M., Erasmus B.J. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective response in sheep. *Virology*, **1987**, 157, 172-179.

Huismans H., Van Dijk A.A. Bluetongue virus structural components. *Current topics in microbiology and immunology*, **1990**, 162, 2141.

Hunter P, Erasmus BJ, Vorster JH. Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. *Onderstepoort J Vet Res.*, **2002**, 69(1):95-8.

Hutcheon D. Fever or epizootic catarrh. *Report of the colonial veterinary surgeon for 1880, 1881*, 12-15.

Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep. *The veterinary record*, **1902**, 14:629-633.

Hyatt A.D., Zhao Y., Roy P. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV non-structural protein NS3/NS3A. *Virology*, **1993**, 193(2):592-603.

Iwata H., Yamagawa M., Roy P. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horse sickness, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology*, **1992**, 191(1):251-261.

Janardhana V, Andrew ME, Lobato ZI, Coupar BE. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res Vet Sci*, **1999**, 67(3):213-21

Janeway A., Travers P., Walport M., Slomchik M. Immunobiology. The immune system in Health and disease, Fifth Edition, **2001**, pp 615-617.

Jeggo M.H., Wardley R.C. Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine*, **1985**; 3(1):57-8.

Jennings D.M., Boorman J.P.T., Ergun H. *Culicoides* from western Turkey in relation to bluetongue disease of sheep and cattle. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **1983**, 36:67-70.

Johnson S., and Roy P. Bluetongue recombinant vaccines. In: *The Proceedings of the 1st Southeast Asia and Pacific Regional Bluetongue Symposium*, Lunming, T.E., St. George, T.E. and P. Kegao, (eds), **1996**, pp. 192-197.

Jones L.D., Williams T., Bishop D., Roy P. Baculovirus-expressed non-structural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **1997**, 4(3):297-301.

Kakach LT, Wasmoen TL, Collett MS. Rift Valley fever virus M segment: use of recombinant vaccinia viruses to study Phlebovirus gene expression. *J Virol.*, **1988**, 62(3):826-33.

Karaca K., Bowen R., Austgen L.E., Teehee M., Siger L., Grosenbaugh D., Loosemore L., Audonnet J.C., Nordgren R., Minke J.M. Recombinant canarypox vectored West Nile virus (WNV) vaccine protects dogs and cats against a mosquito WNV challenge. *Vaccine*, **2005**, 31; 23(29):3808-3813.

Kar A.K., Bhattacharya B., Roy P. Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Molecular Biology*, **2007**, 8:4.

Katz J.B., Middle L.A. Evaluation of thymidine kinase and neomycin phosphotransferase II positive selection systems for recovery of genetically atypical and recombinant DNA vaccine viruses. *Biologicals*, **1990**, 18, 301-304.

Keegan K, Collett MS. Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. *J Virol.*, **1986**, 58(2):263-70.

Kent SJ, Dale CJ, Ranasinghe C, Stratov I, De Rose R, Chea S, Montefiori DC, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Law M,

Wilson KM, Ramsay AJ. Mucosally-administered human-simian immunodeficiency virus DNA and fowlpoxvirus-based recombinant vaccines reduce acute phase viral replication in macaques following vaginal challenge with CCR5-tropic SHIVSF162P3. *Vaccine*, **2005**, 23(42):5009-21.

Kieny M.P., Latho R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H., Lecocq J.P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **1984**, 312:163-166.

Kitching R.P., Hammond J.M., Black D.N. Studies on the major common precipitating antigen of capripox virus. *Journal of general virology*, **1986**, 67:139-148.

Kitching R.P., Hammond J.M., Taylor W.P. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*, **1987**, 42:53-60.

Kitching RP, Bhat PP, Black DN. The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidemiol Infect*, **1989**, 102(2):335-43.

Kramer W.L., Greiner E.C., Gibbs E.P.J. Seasonal variations in population size, fecundity and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. *Journal of medical entomology*, **1985**, 22: 163-69.

Kremer M. Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. Encyclop. Ent. Série A, Ed. P.Lechevallier, Paris, 39, **1965**, 299 pp.

Lagerqvist N., Näslund J., Lundkvist A., Bouloy M., Ahlm C., Bucht G. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs. *Virol J.*, **2009**, 17;6:6.

Le Blois H., French T., Mertens P.P., Burroughs J.N., Roy P. The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. *Virology*, **1992**, 189(2):757-61.

Lefèvre P.C. La fièvre catarrhale du mouton. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 667-686.

Lefèvre P.C., Gourreau J.M. Dermatose nodulaire contagieuse. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et*

parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes.
Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 429-443.

Le Goff C, Lamien CE, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba-Adulugba E, Libeau G, Tuppurainen E, Wallace DB, Adam T, Silber R, Gulyaz V, Madani H, Caufour P, Hammami S, Diallo A, Albina E. Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *J Gen Virol.*, **2009**, 90 (Pt 8):1967-77.

Linley J.R. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of non viral animal pathogens. *Journal of medical Entomology*, **1985**, 22, 589-599.

Linton Y.M., Mordue Luntz A.J., Cruickshank R.H., Meiswinkel R., Mellor P.S., Dallas J.F. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical and veterinary entomology*, **2002**, 16(2):139-46.

Liu X., Kremer M., Broyles S.S. A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis. *Journal of virological methods*, **2004**, 15; 122(2):141-5.

Lobato Z.I., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary immunology and immunopathology*, **1997**, 59(3-4):293-309.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1982**, 79:7415-7419.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. The construction and characterisation of vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. In: Gover D.M., editor. *DNA Cloning: a practical approach*. Oxford : IRL Press, **1985**, pp: 191-211.

Mackett M., Smith G.L. Vaccinia virus expression vectors. *Journal of General Virology*, **1986**, 67:2067-82.

Maggi E., Mazzetti M., Ravina A., Annunziato F., de Carli M., Piccinni M.P., Manetti R., Carbonari M., Pesce A.M., del Prete G., et al. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science*, **1994**, 265 (5169): 244-8.

Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E., Cêtre-Sossah C. Molecular identification of the Western European species of the *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1 rDNA multiplex PCR assay. *Journal of medical entomology*, **2007**, 44(3):000-000.

Meegan JM, Hoogstraal H, Moussa MI. An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1977. *Vet Rec.*, **1979**, 11;105 (6):124-5.

Meiswinkel R., Nevil E.M., Venter E.J. Vectors: *Culicoides* spp. In: J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds, *Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa*, Vol. I. Oxford University Press, Cape Town, Chap.5, **1994**, pp 68-89.

Meiswinkel R., Venter G.J., Nevil E.M. Vectors: *Culicoides* spp. In: J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin, eds, *Infectious diseases of livestock*, Oxford University Press, Cape Town, **2004**, pp. 93–136.

Mellor P.S., Pitzolis G. Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of entomological research*, **1979**, 69:229-34.

Mellor P.S., Osborne R., Jennings D.M. Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* species in the Sudan. *The Journal of hygiene*, **1984**, 93:621-28.

Mellor P.S., Jennings D.M., Wilkinson P.J., Boorman J.P.T. *Culicoides imicola*; a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *The Veterinary record*, **1985**, 116:589-90.

Mellor P.S. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Current topics in microbiology and Immunology*, **1990**, 162; 101.

Mellor P.S. Climate-change and the distribution of vector-borne diseases with special reference to African horse sickness virus. *Proceeding of international symposium of diagnostic and control of livestock disease*. Vienna, Austria, **1998**, pp. 439-454.

Mellor P.S., Boorman J., Baylis M. *Culicoides* biting midges, their role as arboviruses vectors. *Annual review of entomology*, **2000a**, 45:307-340.

Mellor P.S., Leake C.J. Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. *Revue scientifique et technique (Office international des épizooties)*, **2000b**, 19(1):41-54

Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PP. Bluetongue in Europe and the

Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. *Prev Vet Med.*, **2008**, 87(1-2):4-20

Mertens P.P.C., Brown F., Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology*, **1984**, 135, 207-217.

Mertens P.P.C., Burroughs J.N., Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology*, **1987**, 157, 375-386.

Mertens P.P.C., Pedley S., Cowley J., Burroughs J.N., Corteyn A.H., Jeggo M.H., Jennings A.M., Gorman B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, **1989**, 170, 561-565.

Mertens P.P., Burroughs J.N., Walton A., Wellby M.P., Fu H., O'Hara R.S., Brookes S.M., Mellor P.S. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. *Virology*, **1996**, 15; 217(2):582-93.

Minke J.M., Siger L., Karaca K., Austgen L., Gordy P., Bowen R., Renshaw R.W., Loosmore S., Audonnet J.C., Nordgren B. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Archives of virology, Supplementum*, **2004**, (18):221-30.

Mo C.L., Thompson L.H., Homan E.J., Oviedo M.T., Greiner E.C., Gonzalez J. Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *American journal of veterinary research*, **1994**, 55:211-15.

Mohammed M.E.H., Taylor W.P. Infection with bluetongue and related orbiviruses in the Sudan detected by the study of sentinel calf herds. *Epidemiology and Infection*, **1987**, 99:533-545.

Morrill J.C., McClain D.J. The viruses, In: *The Viruses*, Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R Editors, Plenum Press: New York and London, 281-293.

Morrill JC, Peters CJ. Pathogenicity and neurovirulence of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine*, **2003**, 21 (21-22):2994-3002.

Moss B. Poxvirus vectors: cytoplasmic expression of transferred genes. *Current opinion in genetics and development*, **1992**, 3(1)86-90.

Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. New York: Lippincott Raven Press, **1996**, 2637-2702

Mullen G.R., Anderson R.R. Transmission of Orbiviruses by *Culicoides* Latreille species (Ceratopogonidae) among cattle and white-tailed deer in the southeastern United States. *International congress of dipterology*, 4th, Oxford, UK, **1998**, pp. 155-56.

Mullens B.A., Tabachnick W.J., Holbrook F.R., Thompson L.H. Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 *Culicoides variipennis sonorensis*. *Medical and veterinary entomology*, **1995**, 9, 71-76.

Muller M.J., Li H. Preliminary results of trapping for *Culicoides* in south China: future bluetongue vector studies. In: St George T.D., Peng K., eds. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR. **1996**, pp. 129-135.

Murray P.K., Eaton B.T. Vaccines for bluetongue. *Australian veterinary journal*, **1996**, 73(6):207-210.

Mwangi W, Brown WC, Lewin HA, Howard CJ, Hope JC, Baszler TV, Caplazi P, Abbott J, Palmer GH. DNA-encoded fetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. *J Immunol.*, **2002**, 1;169(7):3837-46.

Näslund J, Lagerqvist N, Habjan M, Lundkvist A, Evander M, Ahlm C, Weber F, Bucht G. Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus. *Virology*, **2009**, 15;385(2):409-15.

Neitz W.O. Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort journal of veterinary science*, **1948**, 23:96-136.

Nevill E.M., Erasmus B.J., Venter G.J. A six-year survey of viruses associated with *Culicoides* biting midges throughout South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). In: Walton T.E., Osburn B.I., eds. *Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses*. Boca Raton, FL: CRC. **1992**, pp. 314-319.

Nolan D.V., Carpenter S., Barber J., Mellor P.S., Dallas J.F., Mordue Luntz A.J., Piernney S.B. Rapid diagnostic PCR assays for members of the

Culicoides obsoletus and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary microbiology*, **2007**, 20; 124(1-2):82-94.

OIE. Bluetongue – Netherlands, Belgium, Germany-OIE. *ProMed*. 21 août **2006**. Accessible sur <http://promedmail.org>, archive no.: 20060821.2353.

Pagès N., Sarto I., Monteys V. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Journal of medical entomology*, **2005**, 42(6):1026-34.

Panicali D., Grzeleccki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*. **1986**, 47, 193-199.

Paoletti E., Lipinskas B.R., Samsanoff C., Meror S., Panicali D. Construction of live vaccinia viruses using genetically engineered poxvirus: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein, *D. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1984**, 81:193-197.

Parker J., Herniman K.A.J., Gibbs E.P.J., Sellers R.F. An experimental inactivated bluetongue virus vaccine against bluetongue virus. *Veterinary record*, **1975**, 96:284.

Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Thomas I., Paquot A., Baudouin B., Kieny M.P., Lecocq J.P., Debruyne J., Costy F., Antome H., Desmettre P. First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *The Veterinary record*, **1988**, 123:481.

Pastoret P.P., Brochier B. Development of a recombinant vaccinia-rabies vaccine for oral vaccination of foxes against rabies. *Developments in biological standardization*, **1992**, 79:105-11.

Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Duret C., Chappuis G., Desmettre P. Stability of recombinant vaccinia-rabies vaccine in veterinary use. *Developments in biological standardization*, **1996**, 87:245-259.

Pastoret P.P., Vanderplassen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases*, **2003**, 26:343-355.

Paweska J.T., Venter G.J., Mellor P.S. Vector competence of South African *Culicoides* species for

bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Medical and veterinary entomology*. **2002**, 16(1):10-21.

Pearce E.J., Caspar P., Grzych J.M., Lewis F.A., Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med.*, **1991**, 173(1):159-66.

Pedley S., Mohamed M.E.H., Mertens P.P.C. Analysis of the genome segments of six different bluetongue virus isolates using RNA-RNA hybridisation: A generalised coding assignment for bluetongue viruses. *Virus research*, **1988**, 10,381-390.

Perkus M.E., Piccini A., Lipinskas B.R., Paoletti E. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science*, **1985**, 229:981-984.

Perkus M.E., Goebel S.J., Davis S.W., Johnson G.P., Norton E.K., Paoletti E. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology*, **1991**, 180:406-410.

Perrin A., Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and veterinary entomology*, **2006**, 20(2):219-28.

Perrin A., Albina E., Breard E., Sailleau C., Prome S., Grillet C., Kwiatek O., Russo P., Thiery R., Zientara S., Cêtre-Sossah C. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, **2007**, 25(37-38):6774-83.

Peters C and Linthicum K. Rift Valley Fever. In: Handbook series in Zoonoses, sectionB: viral zoonoses second edition, Beron GW, Steele JH Editors, CRC Press:Boca Raton, **1994**, 125-138.

Phillips SM, Bentley AG, Linette G, Doughty BL, Capron M. The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. In vivo studies of resistance. *J Immunol.*, **1983**, 131(3):1466-74.

Piccini A., Perkus M.E., Paoletti E. Vaccinia virus as an expression vector. *Methods in enzymology*, **1987**, 153:545-563.

Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature: reviews in microbiology*, **2005**, 3(2):171-81.

Randall R., Binn L.N., Harrison V.R. Immunisation against RVF virus. Studies on the immunogenicity of lyophilized formalin-inactivated vaccine. *J Immunol.*, **1964**, 93:293-9.

Rigby P.W.J. Cloning vectors derived from animal viruses. *Journal of general virology*, **1983**, 64:255-266.

Romero C.H., Barrett T., Evans S.A., Kitching R.P., Gershon P.D., Bostock C., Black D.N. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, **1993**, 11(7):737-42.

Romero C.H., Barrett T., Chamberlain R.W., Kitching R.P., Fleming M., Black D.N. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, **1994**, 204(1):425-9.

Roy P., Fukusho A., Ritter D.G., Lyons D. Evidence for genetic relationship between RNA and DNA viruses from the sequence homology of a putative polymerase gene of bluetongue virus with that of vaccinia virus: conservation of RNA polymerase gene from diverse species. *Nucleic acids research*, **1988**, 16, 11759-11767.

Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structures. *Virus research*, **1989**, 13,179-206.

Roy P., Adachi A., Urakawa T., Booth T.F., Thomas C.P. Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *Journal of virology*, **1990a**, 64(1):1-8.

Roy P., Urakawa T., Van Dijk A.A., Erasmus B.J. Recombinant virus vaccine for Bluetongue disease in sheep. *Journal of virology*, **1990b**, 64:1998-2003.

Roy P. Bluetongue virus proteins. *Journal of general virology*, **1992**, 73:3051-3064.

Roy P., French T.J., Erasmus B.J. Protective efficacy of virus-like particles for Bluetongue disease. *Vaccine*, **1992**, 10:28-32.

Roy P., Bishop D.H.L., LeBlois H., Erasmus B.J. Long-lasting protection of sheep against Bluetongue challenge after vaccination with virus-

like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine*, **1994a**, 12:805-811.

Roy P., Callis J., Erasmus B.J. Protection of sheep against Bluetongue disease after vaccination with core-like and virus-like particles: Evidence for homologous and partial heterologous protection. In: *Proceeding for 97th Annual Meeting, USA Health Association*, Las Vegas, Nevada, USA. **1994b** pp. 88-97.

Sanchez-Puig J.M., Blasco R. Puromycin resistance (pac) gene as a selectable marker in vaccinia virus. *Gene*, **2000**, 57-65.

Sarver N., Gruss P., Law M.F., Khoury G., Howley P.M. Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eukaryotic cloning vector. *Molecular and cellular biology*, **1981**, 1:486-496.

Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletus complex (Culicoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *The veterinary record*, **2005**, 30; 157(5):133-9.

Sellers R.F., Gibbs E.P.J., Herniman K.A.J., Pedgley D.E., Tucker M.R. Possible origin of the bluetongue epidemic in Cyprus. *The journal of hygiene*, **1979**, 83:547-555.

Sellers R.F. Weather, host and vector – Their interplay in the spread of insect borne animal virus diseases. *The journal of hygiene*, **1980**, 85:65-102.

Sellers R.F., Maarouf A.R. Trajectory analysis and bluetongue virus serotype 2 in Florida in 1982. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **1989**, 53:100-102.

Sendow I., Sukarsih D., Soleha E., Pearce M., Bahri S., Daniels P.W. Bluetongue virus research in Indonesia. In: St George TD, Peng K, eds. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR. **1996**, pp. 28–32.

Sharifah S.H., Ali M.A., Gard G.P., Polkinghorne I.G. Isolation of multiple serotypes of bluetongue virus from sentinel livestock in Malaysia. *Tropical animal health and production*, **1995**, 27(1):37-42.

Schmaljohn CS, Parker MD, Ennis WH, Dalrymple JM, Collett MS, Suzich JA, Schmaljohn AL. Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and

examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins. *Virology*, 1989, 170(1):184-92.

Shimotohno K., Temin H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene onto DNA of an avian retrovirus. *Cells*, 1981, 26:67-77.

Singh R.P., De U.K., Pandey K.D. Virological and antigenic characterization of two Peste des Petits Ruminants (PPR) vaccine viruses of Indian origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb 4.

Smith G.L., Mackett M., Moss B. Recombinant vaccinia viruses as new live vaccines. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 1984, 2:383-407.

Smithburn K.C. Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br J Exp Pathol.*, 1949, 30 (1):1-16.

Solnick D. Construction of an adenovirus SV40 recombinant producing SV40 T-antigen from an adenovirus late promoter. *Cells*, 1981, 24:135-143.

Spik K, Shurtleff A, McElroy AK, Guttieri MC, Hooper JW, SchmalJohn C. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 2006, 22;24(21):4657-66.

Spreull J. Report from veterinary surgeon Spreull on the result of his experiments with the malarial catarrhal fever of sheep. *Agricultural journal of the cape of good hope*, 1902, 20:469-477.

Spreull J. Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of comparative pathology*, 1905, 18:321-337.

Standfast H.A., Dyce A.L., Muller M.J. Vectors of bluetongue virus in Australia. In: Barber T.L., Jochim M.M., eds. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York: Liss. 1985, pp. 177-186

Stäuber N., Martinez-Costas J., Sutton G., Monastyrskaya K., Roy P. Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *Journal of virology*. 1997, 71(10):7220-6.

Stevens D.R. Stott J., Osburn B.I., Giles R., Wiesehahn G.P., Barber T.L. Potency and efficacy of inactivated bluetongue virus vaccines.

Progress in clinical biological research, 1985, 178:649.

Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L. The current status of research on an experimental inactivated bluetongue virus vaccine. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*, 1979, 83:55.

Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L. Immunologic response of sheep to inactivated vaccine against bluetongue virus. *American journal of veterinary research*, 1985, 46:1043.

Sukarsih D., Daniels P.W., Sendow I., Soleha E. Longitudinal studies of *Culicoides* spp. associated with livestock in Indonesia. In: Uren MF, Kay BH, eds., *Arbovirus Research in Australia*, 6th, Brisbane, Brisbane: CSIRO/QIMR, 1993, pp. 203-9.

Sukarsih D., Sendow I., Bahri S., Pearce M., Daniels P.W. *Culicoides* survey in Indonesia. In: St George T.D., Peng K., eds., *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR. 1996, pp. 123-128.

Suzich J., L. Kakach and Collett M. Expression Strategy of a Phlebovirus: Biogenesis of Proteins from the Rift Valley Fever Virus M Segment. *Journal of Virology*, 1990, 64:1549-1555.

Tabachnick W.J. Genetics, population genetics and evolution of *Culicoides variipennis*: implications for bluetongue virus transmission in the USA and its international impact. In: Walter T.E, Osburn B.I., eds., *Bluetongue, African Horse sickness and related orbiviruses*. Boca Rata, FL: CRC. 1992, pp262-70.

Tabachnick W.J. and Holbrook F.R. The *Culicoides variipennis* complex and the distribution of the bluetongue viruses in the United States. *Proceedings of United States Animal Health Association*, 1992, 96:207-12.

Theiler A. Bluetongue in sheep. *Annual Report of the Director of Agriculture, Transvaal for 1904-1905*, 1906, 110-121.

Theron J., Uitenweerde J.M., Huismans H., Nel L.H. Comparison of the expression and phosphorylation of the non-structural protein NS2 of three different orbiviruses: evidence for the involvement of an ubiquitous cellular kinase. *Journal of general virology*, 1994, 75:3401-11.

Thiry E., Saegerman C., Guyot H., Kirten P., Losson B., Rollin F. Bluetongue in northern Europe. *The veterinary record*, 2006, 159:327.

Thiry E. Virologie Clinique des Ruminants, Editions du Point Vétérinaire, Rueil-Malmaison, France, **2007**, pp.233.

Thomas C.P., Booth T.F., Roy P. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of general virology*, **1990**, 71:2073-83.

Thummel C., Tjian R., Grodzicker T. Expression of SV40 T-antigen under control of adenovirus promoters. *Cells*, **1981**, 23:825-836.

Timiryasova T.M., Chen B., Fodor N., Fodor I. Construction of recombinant vaccinia viruses using PUV-Inactivated Virus as a helper. *Biotechniques*, **2001**, 31:534-540.

Toussaint J.F., Sailleau C., Mast J., Houdart P., Czaplicki G., Demeestere L., VandenBussche F., Van Dessel W., Goris N., Bréard E., Bounaadja L., Thiry E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerging Infectious disease*, **2007**, 13(4):614-616.

Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Zsak L., Kutish G. F., Rock D. L. Genome of Lumpy Skin Disease Virus. *Journal of virology*, **2001**, 75(15):7122-7130.

Urakawa T., Ritter D.G., Roy P. Expression of the largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. *Nucleic Acids Research*, **1989**, 17, 7395-7401.

Urakawa T, French TJ, Adachi Y, Fukusho A, LeBlois H, Flamand M, Mertens P, Roy P. Synthesis of recombinant baculoviruses expressing the outer capsid protein VP2 of five BTV serotypes and the induction of neutralizing antibodies to homologous and heterologous BTV serotypes. *Virus Res.*, **1994**, 31(2):149-61

Venter G.J., Meiswinkel R. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the Orange Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. *Onderstepoort journal of veterinary research*, **1994**, 61: 327-40.

Venter G.J., Paweska J.T., Van Dijk A.A., Mellor P.S., Tabachnick W.J. Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4.

Medical and veterinary entomology, **1998**, 12:378–85.

Verwoerd D.W. Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology*, **1969**, 38, 203-212.

Verwoerd D.W., Erasmus B.J. Bluetongue. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustion R.C., eds. *Infectious Diseases of Livestock with special reference to Southern Africa*. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, **1994**, pp: 443-459.

Wade-Evans A.M., Romero C.H., Mellor P., Takamatsu H., Anderson J., Thevasagayam J., Fleming M.J., Mertens P.P., Black D.N. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*, **1996**, 220(1):227-31.

Walker A.R., Davies F.G. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya. *The Journal of hygiene*, **1971**, 69: 47-60

Wahid.2008 Peste des petits ruminants, Morocco (Follow-up Report 9 : 16/10/2008)

Wallace D.B., Viljoen G.J. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). *Archives of Virology*, **2002**, 147(3):659-63.

Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of LSDV generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **2005**; 23:3061-3067.

Wallace D.B., Ellis C.E., Espach A., Smith S.J., Greyling R.R., Viljoen G.J. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine*, **2006**, 30; 24(49-50).

Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *Journal of virological methods*, **2007**, doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.004.

Wei C.W., Gibson M., Spear P.G., Scolnick E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*, **1981**, 39:935-944.

Wieser-Schimpf L., Wilson W.C., French D.D., Baham A., Foil L.D. Bluetongue virus in sheep

and cattle and *Culicoides variipennis* and *C. stellifer* (Diptera: Ceratopogonidae) in Louisiana. *Journal of medical entomology*, **1993**, 30(4):719-24

Wittmann E.J. *Temperature and the transmission of arboviruses by Culicoides*. PhD thesis. **1999**, University of Bristol, Bristol.

Wittmann E.J., Mellor P.S., Baylis M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*; *Medical and veterinary entomology*, 16, **2002**, 147-156.

Wu X., Chen S.Y., Iwata H., Compans R.W., Roy P. Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus. *Journal of virology*, **1992**, 66(12):7104-12

Xu G., Wilson W., Mecham J., Murphy K., Zhou E.M., Tabachnick W. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *Journal of general virology*, **1997**, 78:1617-1623.

Yamashita T, Boros DL. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol*. **1992**;149(11):3659-64.

Yeruham I, Perl S., Nyska A., Abraham A., Davidson M., Haymovitch M., Zamir O.,

Grinstein H. Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. *The veterinary record*, **1994**, 135(14):330-2.

Zavala F., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Nussenzweig R.S., Esteban M. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8 (+) T cells. *Virology*, **2001**, 280(2):155-9.

Zhang N., MacLachlan N.J., Bonneau K.R., Zhu J., Li Z. Identification of seven serotypes of bluetongue virus from the People's Republic of China. *The veterinary record*, **1999**, 9; 145(15):427-9

Zientara S., De la Rocque S., Gourreau J.M., Gregory M., Diallo A., Hendrix P., Libeau G., Sailleau C., Delécolle J.C. La Fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidémiologie et santé animale*, **2000**, 38:133-144.

Zientara S., Sailleau C., Dauphin G., Roquier C., Rémond E.M., Lebreton F., Hammoumi S., Dubois E., Agier C., Merle G., Bréard E. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *The veterinary record*, **2002**, 150(19):598-601.

CHAPITRE 5 :
CHOIX DE 5 PUBLICATIONS REPRESENTATIVES

Available online at www.sciencedirect.com

Research in Veterinary Science 85 (2008) 372–382

www.elsevier.com/locate/rvsc

Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe

Catherine Cêtre-Sossah^{a,*}, Bruno Mathieu^b, Marie-Laure Setier-Rio^b, Colette Grillet^a, Thierry Baldet^c, Jean-Claude Delécolle^d, Emmanuel Albina^a

^a CIRAD, Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, UPR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier cedex 05, France

^b EID-Méditerranée, Entente Interdépartementale pour la Démoustication, 165 Avenue Paul Rimbaud, F-34184 Montpellier cedex 4, France

^c CIRAD, Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, UPR Epidémiologie, F-34398 Montpellier cedex 05, France

^d Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée zoologique, 29 bd de la Victoire, F-67000 Strasbourg, France

Accepted 3 December 2007

Abstract

The current microscopy method for identifying the *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 species can be time and labour intensive. There is a need for the development of a rapid and quantitative tool to quantify the biting midges *C. imicola* ss in light trap catches. A reproducible and sensitive real-time polymerase chain reaction method that targets the internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA of *C. imicola* ss species was developed. This real-time PCR assay was first performed on 10-fold serial dilutions of purified plasmid DNA containing specific *C. imicola* ss ITS-1. It was then possible to construct standard curves with a high correlation coefficient ($r^2 = 0.99$) in the range of 10^{-2} – 10^{-8} ng of purified DNA. The performances of this PCR were evaluated in comparison with morphological determination on *Culicoides* trapped along the Mediterranean coastal mainland France. ROC statistical analysis was carried out using morphology as gold standard and the area under the ROC curve had a satisfactory value of 0.9752. The results indicated that this real-time PCR assay holds promise for monitoring *C. imicola* ss population in both surveillance and research programmes because of its good specificity (92%) and sensitivity (95%).

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Real-time PCR; *Culicoides imicola* ss; Bluetongue; African horse sickness

1. Introduction

Bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) are infectious arthropod-borne viral diseases caused by viruses belonging to the genus *Orbivirus* within the family *Reoviridae* and transmitted by certain species of biting midges belonging to the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) (Holmes et al., 1995). The virus is maintained in nat-

ure through a series of alternating cycles of replication between its *Culicoides* vectors and susceptible hosts (Mellor, 1990). BT mainly affects sheep but also occurs in cattle, goats and wildlife ruminants in asymptomatic form (Verwoerd and Erasmus, 1994) whereas AHS occurs in equids. The genus *Culicoides* Latreille is currently represented by some 1340 species (Borkent and Wirth, 1997; Beckenbach and Borkent, 2003) including several complexes of sibling species but only 32 species have been connected with BTV transmission (Meiswinkel et al., 2004; Mellor, 1990). The major vector species are *C. imicola* ss and *C. bolitinos* in sub-saharian Africa; *C. imicola* ss in Northern Africa and in Asia; *C. brevitarsis* in Southern

* Corresponding author. Address: CIRAD, Département Bios, UPR15, TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, F-34398 Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 0 4 67 59 39 11; fax: +33 0 4 67 59 37 98.

E-mail address: catherine.cetre-sossah@cirad.fr (C. Cêtre-Sossah).

Asia and in Australia; *C. sonorensis* in North America, *C. insignis* and *C. pusillus* in Southern and Central America (Meiswinkel, 1989; Mellor, 1990).

The explosive outbreaks of BTV in the Mediterranean Basin since 1998 have been fuelled largely by the classical Afro-Asian vector *C. imicola* ss (Baylis, 2002; Mellor and Wittmann, 2002). It is known that *C. imicola* sl is a complex of at least 10 sibling species but for the time being only *C. imicola* ss is present in Europe (Linton et al., 2002). However, outbreaks have been reported in the Eastern Mediterranean Basin (Bulgaria, Serbia, Kosovo, Croatia, Montenegro, Northern Greece, Bosnia Herzegovina) where the classical Afro-Asian vector *C. imicola* ss, has never been detected during insect surveys (Baylis and Mellor, 2001; Mellor and Wittmann, 2002; Purse et al., 2006). More recent outbreaks occurred in Northern Europe (Belgium, Germany, Holland and France) in the absence of *C. imicola* ss but with the implication of *Obsoletus* complex species (*C. obsoletus* Meigen, *C. scoticus* Downes and Kettle, *C. dewulfi* Goetghebuer) (Meiswinkel, 2006; Anon, 2006; Thiry et al., 2006).

As a consequence of BTV serotype 2 outbreaks in the island of Corsica in October 2000 and the discovery of the presence of *C. imicola* ss (Zientara et al., 2001; Delécolle and De La Rocque, 2002), and the relatively high risk of occurrence of this vector in neighbouring coastal mainland in Southern France (Wittmann et al., 2001; Tatem et al., 2003), a surveillance has been implemented by French authorities in sentinel herds by serology and by entomology through a light trap network (Baldet et al., 2004, 2005). According to the European Union (EU) policy, these surveillance programs were applied both in BT-free areas (Southern French coastal mainland since 2000) and in infected areas (Corsica and more recently Northern France since August 2006). Diagnostic tests are a major component of the surveillance systems. The morphological identification of *Culicoides* can be both tedious and time consuming because of the size of the midges ranging from 1.5 to 3 mm. In addition, there is a lack in Europe of taxonomists able to identify *Culicoides* species. Thus the aim of this study, based on previous studies on the development of diagnostic assays and phylogenetic analysis (Li et al., 2003; Cêtre-Sossah et al., 2004; Perrin et al., 2006; Mathieu et al., 2007) was to develop a reproducible real-time PCR method that targets the first internal transcribed spacer (rDNA ITS-1) for the quantitative surveillance of *C. imicola* ss in light trap catches and to evaluate the performances of this method in comparison with the morphological determination considered as the current gold standard.

2. Materials and methods

2.1. Field collections

The sites at risk selected for the entomosurveillance of *C. imicola* ss into mainland France are spread at 50 km

intervals along the French Mediterranean coast (Baldet et al., 2004). One collection/night/site, using standard UV-light traps with a suction fan, was performed monthly from April to November 2004. Traps were set on each night, for 1 h before sunset to approximately 1 h after the sunrise of the following morning. They were located outdoors but within 25 m of livestock premises and were suspended at about 1.5–2 m above ground so that trap lights illuminate a 360° area. A glass collecting beaker containing 200–300 ml of water with a drop of detergent to reduce surface tension was placed at the base of each trap. Collected insects were transported to the laboratory in the water-filled collecting beaker and then recovered and preserved in 90% ethanol. *Ceratopogonidae* were first separated from all other insects with the preservation of all insects present in order to reconstitute later on the whole original sample. Specimens of the genus *Culicoides* were identified at species level and the absence of *C. imicola* ss was confirmed based microscopically upon wing pattern (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Delécolle, 1985; Delécolle and De La Rocque, 2002). Then, 99 original trap catches, coming from this entomosurveillance network carried out in 2004, were reconstituted with specimens of all insects families, and specimens belonging to different species of *Culicoides* as presented in Table 1. One additional light trap catch was an original sample with already one specimen of *C. imicola* ss. Either 1 or 5 specimens of Corsican *C. imicola* ss (origin Pietra Corbara, Corsica, Geographic coordinate 09°25'44"E/42°50'45"N) were further added randomly in some of the 99 sampled trap catches – One *C. imicola* ss specimen was added in 20 samples and five specimens added in the 20 other samples. The remaining 59 trap catches were the negative samples. To assess the capacity of the real-time PCR assay to quantify *C. imicola* ss, 12 individual trap catches were reconstituted with 10, 50, 100 or 1000 *C. imicola* ss as previously described (three trap catches for each condition).

2.2. Extraction of genomic DNA

After grinding up to 50 mg of insects in a mortar and pestle containing liquid nitrogen, the extraction of DNA was performed with the DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Construction of the *C. imicola* ss ITS-1 PCR-blunt plasmid

The purified ITS-1 *C. imicola* ss specific PCR product was cloned into PCR-blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, USA), using chemically competent *E. coli*. Intraspecific variation within the ITS-1 region has already been evaluated at 99.8% (Perrin et al., 2006). To confirm the presence of the insert, PCR amplification with PanCulF/PanCulR primers (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'/5'-TGCGGTCITCATCGAACCCAT-3') was performed on 10 bacterial clones for each species. Three

Table 1
Composition of the light trap catches used for the PCR assays

Collection locality/date	Geographic coordinate	Qty (mg)	Nb Cerat	Nb Cul	Species (nb)	Nb imi
Vence/21 22/07/2004	7° 5' 57" E/43° 43' 25"	56.9	22	19	cat (1), kibu (3), Obs (15)	5
Menton/28 29/06/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	34.6	8	3	Obs (1), spp (2)	0
Roquette sur siagne/21 22/07/2004	6° 56' 31" E/43° 34' 59"	71.4	92	20	cat (3), gris (1), jum (4), new (11), subf (1)	1
Roquette sur siagne/28 29/06/2004	6° 56' 31" E/43° 34' 59"	43.9	16	8	cat (5), jum (3)	1
Menton/21 22/07/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	34.1	6	2	cat (2)	0
Vence/28 29/06/2004	7° 5' 57" E/43° 43' 25"	60.7	8	7	Obs (6), puli (1)	5
Menton/9 10/09/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	53.5	37	5	cat (1), gris (3), sha (1)	0
Roquette sur siagne/18 19/08/2004	6° 56' 31" E/43° 34' 59"	58	23	18	cat (2), cir (2), fes (3), jum (5), spp (6)	1
Roquette sur siagne/23 24/09/2004	6° 56' 31" E/43° 34' 59"	35.2	12	7	jum (1), Obs (3), spp (3)	0
Menton/9 10/09/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	89.5	11	1	puncta (1)	5
Vence/18 19/08/2004	7° 5' 57" E/43° 43' 25"	130	4	3	Obs (1), spp (2)	1
Menton/18 19/08/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	230	33	3	cat (2), kibu (1)	0
Vence/23 24/09/2004	7° 5' 57" E/43° 43' 25"	50.1	0	0	none	1
Roquette sur siagne/26 27/10/2004	6° 56' 31" E/43° 34' 59"	13.5	11	9	cat (1), new (2), Obs (2), puli (4)	5
Menton/26 27/10/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38"	84	13	0	none	0
Grau du Roi/28 29/07/2004	1° 47' 02" E/43° 33' 06"	28	6	3	cat (1), cir (2)	0
Grau du Roi/30 31/08/2004	1° 47' 02" E/43° 33' 06"	25.8	15	4	cir (1), new (3)	5
Vic la Gardiole/28 29/07/2004	3° 46' 33" E/43° 28' 53"	56.1	6	6	cir (3), new (1), saha (1), subm (1)	0
Assas/28 29/07/2004	1° 33' 45" E/43° 43' 08"	123.1	9	1	Obs (1)	5
Assas/01 02/09/2004	1° 33' 45" E/43° 43' 08"	44.9	31	4	cat (3), Obs (1)	0
Nissan lez enserune/13 14/09/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00"	42	99	16	cat (4), cir (1), mar (1), new (10)	0
Assas/21 22/09/2004	1° 33' 45" E/43° 43' 08"	57.1	54	4	cir (1), Obs (3)	0
Portiragnes/11 12/08/2004	3° 20' 16" E/43° 17' 0"	116.4	21	19	cat (5), cir (6), mar (2), new (4), puncti (1), saha (1)	5
Portiragnes/25 26/11/2004	3° 20' 16" E/43° 17' 0"	18.3	0	0	none	5
Nissan lez enserune/25 26/11/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00"	46.7	0	0	none	0
Portiragnes/13 14/09/2004	3° 20' 16" E/43° 17' 0"	25.4	2	1	cat (1)	0
Nissan lez enserune/11 12/08/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00"	67.5	8	3	cir (2), new (1)	0
Vic la Gardiole/01 02/09/2004	3° 46' 33" E/43° 28' 53"	140	10	7	cir (2), new (4), saha (1)	0
Portiragnes/07 08/07/2004	3° 20' 16" E/43° 17' 0"	39.6	1	1	new (1)	5
Vic la Gardiole/21 22/09/2004	3° 46' 33" E/43° 28' 53"	30.4	152	13	cat (3), cir (4), mar (2), new (4)	0
Argeles sur mer/04 05/10/2004	3° 3' 6" E/42° 31' 31" N	33.6	3	3	new (2), puli (1)	0

Table 1 (continued)

Collection locality/date	Geographic coordinate	Qty (mg)	Nb Cerat	Nb Cul	Species (nb)	Nb imi
Salses/04 05/10/2004	2° 57' 13" E/42° 49' 25" N	116	2362	2362	gris (1), new (2360), subm (1)	1
Argeles sur mer/02 03/09/2004	3° 3' 6" E/42° 31' 31" N	20.7	2	2	Obs (1), saha (1)	0
Salses/02 03/09/2004	2° 57' 13" E/42° 49' 25" N	38.5	919	919	gris (1), new (918)	0
Salses/16 17/08/2004	2° 57' 13" E/42° 49' 25" N	45.6	146	145	new (144), puncta (1)	0
St Nazaire/23 24/06/2004	0° 39' 40" E/42° 39' 22" N	109	211	169	cat (4), cir (6), gris (61), jum (2), mar (43), new (26), Obs (5), puncta (1), subm (21)	0
Salses/23 24/06/2004	2° 57' 13" E/42° 49' 25" N	120	4104	4087	gris (92), mar (68), new (3907), puncta (1), subm (19)	5
Argeles sur mer/11 12/08/2004	3° 3' 6" E/42° 31' 31" N	66.6	13	27	new (1), Obs (7), subf (19)	5
St Nazaire/12 13/08/2004	0° 39' 40" E/42° 39' 22" N	407	130	107	cat (2), cir (12), mar (3), new (88), puncta (1), puncti (1)	0
St Nazaire/02 03/09/2004	0° 39' 40" E/42° 39' 22" N	52	113	108	new (107), subf (1)	0
Castellet/21 22/07/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	40	16	16	new (5), Obs (9), pul (2)	0
Roquebrune sur Argens/15 16/09/2004	6° 38' 23" E/43° 26' 51" N	87.5	3	2	fes (1), new (1)	0
St Nazaire/07 08/07/2004	0° 39' 40" E/42° 39' 22" N	85	405	331	cir (85), gris (101), mar (33), new (55), pun (26), sub (11), spp (20)	0
St Nazaire/04 05/10/2004	0° 39' 40" E/42° 39' 22" N	28.9	392	337	cat (2), cir (3), mar (4), new (318), pun (2), pul (5), spp. (3)	0
Salses/07 08/07/2004	2° 57' 13" E/42° 49' 25" N	198.1	8230	8172	cir (11), gris (835), mar (33), new (7254), puncta (15), puli (2), subm (15), spp (7)	0
Argeles sur mer/07 08/07/2004	3° 3' 6" E/42° 31' 31" N	56.7	91	60	new (1), Obs (49), puncta (6), puli (3), spp. (1)	0
Grau du Roi/21 22/09/2004	1° 47' 02" E/43° 33' 06" N	178	8	2	new (1), mar (1)	1
Castellet/28 29/06/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	218.7	72	69	cat (1), new (52), Obs (21), puncta (1), puli (3), spp. (1)	0
Les Pennes Mirabeau/23 24/08/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	45.5	4	2	spp (2)	1
Roquebrune sur Argens/28 29/06/2004	6° 38' 23" E/43° 26' 51" N	30	61	24	cir (14), Obs (10)	1
St Mitre les remparts/29 30/07/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	60	204	199	cat (1), cir (2), jum (1), new (192), Obs (1), puncta (1), spp (1)	1
Les Pennes Mirabeau/29 30/06/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	40	213	157	cat (13), cir (37), mari (3), new (61), Obs (2), parro (26), subm (4), spp (11)	0
St Mitre les remparts/29 30/06/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	525	3043	1355	cat (60), cir (101), jum (374), mar (4), new (754), Obs (8), puncta (4), puli (2), spp (48)	0
St Mitre les remparts/23 24/08/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	115	371	364	cat (2), cir (2), gris (1), jum (10), new (349)	0
Tarascon/29 30/06/2004	2° 19' 39" E/43° 47' 58" N	4.1	0	0	none	0
St Mitre les remparts/28 29/09/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	98	570	567	cir (2), jum (1), new (561), Obs (2), puncta (1)	0
Aries/28 29/07/2004	2° 18' 37" E/43° 40' 02" N	98.8	38	35	cat (1), new (34)	0
Vic la Gardiole/24 25/06/2004	3° 46' 33" E/43° 28' 53" N	129	122	108	cir (4), mar (6), new (50), subm (39), spp (9)	0
Roquebrune sur Argens/18 19/08/2004	6° 38' 23" E/43° 26' 51" N	127.8	24	8	cir (1), spp (7)	1
Aries/23 24/08/2004	2° 18' 37" E/43° 40' 02" N	29	14	14	cat (1), cir (1), jum (2), new (10)	5
Les Pennes Mirabeau/29 30/07/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	97.2	5	3	cir (1), new (1), Obs (1)	5
Solies Pont/18 19/08/2004	6° 2' 57" E/43° 7' 51" N	199.3	14	6	cat (1), Obs (1), spp (4)	0
Solies Pont/21 22/07/2004	6° 2' 57" E/43° 7' 51" N	41	1	0	none	1

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Collection locality/date	Geographic coordinate	Qty (mg)	Nb Cerat	Nb Cul	Species (nb)	Nb imi
Tarascon/23 24/08/2004	2° 19' 39" E/43° 47' 58" N	13.3	0	0	none	0
Tarascon/28 29/07/2004	2° 19' 39" E/43° 47' 58" N	12.5	2	0	none	1
Vidauban/08 09/11/2004	6° 29' 5" E/43° 26' 14" N	10.6	0	0	none	0
Les Pennes Mirabeau/28 29/09/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	2.4	3	3	mar (1), new (2)	5
Vic la Gardiole/08 09/11/2004	3° 46' 33" E/43° 28' 53" N	10.7	12	4	cir (2), new (1), Obs (1)	0
Assas/08 09/11/2004	1° 33' 45" E/43° 43' 08" N	3.5	1	1	cir (1)	0
St Mitre les remparts/14 15/04/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	12.1	60	58	new (56), Obs (2)	0
Castelet/27 28/04/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	4.7	12	12	new (5), Obs (5), puli (2)	5
Portiragnes/24 25/06/2004	3° 20' 16" E/43° 17' 0" N	11.1	161	105	cat (6), circ (4), gris (2), mar (1), new (68), Obs (2), puncta (1), puncti (13), saha (3), subm (4), spp (1)	0
Nissan lez enserune/24 25/06/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00" N	5.3	45	34	cat (4), cir (6), gris (4), jum (5), lon (2), mar (2), new (3), Obs (1), saha (1), subm (3), spp (3)	0
Grau du Roi/16 17/06/2004	1° 47' 02" E/43° 33' 06" N	8.3	56	52	flavi (1), mar (2), new (40), Obs (8), subm (1)	1
Castelet/08 09/11/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	5.5	0	0	none	0
Nissan lez enserune/21 22/04/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00" N	8.5	1	0	none	0
Les Pennes Mirabeau/14 15/04/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	11.7	2	2	circ (1), new (1)	1
St Mitre les remparts/23 24/11/2004	5° 0' 6" E/43° 26' 18" N	14.8	3	1	Obs (1)	0
Les Pennes Mirabeau/23 24/11/2004	5° 16' 20" E/43° 24' 13" N	20.5	0	0	none	1
Aries/27 28/09/2004	2° 18' 37" E/43° 40' 02" N	18.9	0	0	none	0
Vidauban/18 19/08/2004	6° 29' 5" E/43° 26' 14" N	76.4	734	675	cat (2), cir (5), flavi (1), longi (4), news (2), Obs (20), subf (2), spp (639)	1
Castelet/18 19/08/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	183.7	170	162	cat (24), new (51), Obs (72), puli (15)	5
Castelet/23 24/09/2004	3° 26' 13" E/43° 12' 36" N	15.4	10	2	new (1), spp (1)	0
Solies Pont/21 22/07/2004	6° 2' 57" E/43° 7' 51" N	18.6	48	5	cat (4), puli (1)	1
Nissan lez enserune/07 08/07/2004	0° 47' 09" E/43° 17' 00" N	10.8	10	1	spp (1)	0
Vidauban/23 24/09/2004	6° 29' 5" E/43° 26' 14" N	30	139	64	cat (2), cir (1), fes (1), flavi (1), het (9), lon (2), new (1), Obs (14), puli (2), puncta (2), spp (29)	0
Jonquières/28 29/07/2004	2° 42' 45" E/43° 2' 17" N	16.6	372	196	flavi (2), new (4), Obs (92), puli (58), puncta (36), subf (3), spp (1)	5
Vidauban/28 29/06/2004	6° 29' 5" E/43° 26' 14" N	79.8	105	39	cat (1), mal (14), Obs (7), pic (17)	5
Vidauban/21 22/07/2004	6° 29' 5" E/43° 26' 14" N	63.6	159	75	cat (5), cir (3), fes (1), het (2), lon (2), Obs (4), puli (1), puncta (1), spp (56)	0
Jonquières/22 23/09/2004	2° 42' 45" E/43° 2' 17" N	22.7	15	6	cir (3), kibu (1), puli (1), puncta (1)	0
Jonquières/2 3/09/2004	2° 42' 45" E/43° 2' 17" N	27.6	85	75	cat (1), flavi (1), het (2), lon (1), lup (1), new (18), Obs (32), par (1), puli (7), puncta (3), spp (8)	1
Menton/4 5/08/2004	7° 29' 5" E/43° 47' 38" N	16	42	42	cat (2), spp (40)	0
Jonquières/2 3/09/2004	2° 42' 45" E/43° 2' 17" N	26.9	30	22	cat (3), het (2), new (1), Obs (6), spp (10)	5
Puget s/Argens/03 04/08/2004	6° 40' 17" E/43° 27' 08" N	1.3	19	10	cat (3), new (3), Obs (1), pic (2), spp (1)	0

Table 1 (continued)

Collection locality/date	Geographic coordinate	Qty (mg)	Nb Cerat	Nb Cul	Species (nb)	Nb imi
Roquebrune s/Argens/02 03/08/2004	6° 38' 23" E/43° 26' 51" N	36	80	58	cat (3), cir (6), Obs (11), spp (38)	0
St Laurent-du-Var/11 12/08/2004	7° 10' 58" E/43° 42' 27" N	3.1	4	1	spp (1)	0
St Laurent-du-Var/25 26/07/2004	7° 10' 58" E/43° 42' 27" N	10.6	4	1	Obs (1)	5
St Blaise/27 28/06/2004	7° 14' 06" E/43° 49' 17" N	11.3	158	139	cat (3), cir (1), Obs (116), puli (1), spp (18)	0
Jonquières/24 25/06/2004	2° 42' 45" E/43° 2' 17" N	25	448	408	cir (2), het (12), lon (2), lup (17), new (2), Obs (142), puli (151), puncta (61), puncti (1), saha (1), subf (5), spp (12)	5
Roquebrune s/Argens/02 03/08/2004	6° 38' 23" E/43° 26' 51" N	3.2	2	2	imi (1), new (1)	1

Qty (mg) means the quantity of insects, Nb Cerat the number of ceratopogonids and Nb Cul, the number of *Culicoides* present in the light trap catches. Nb imi corresponds to the number of *C. imicola* ss (Pietra Corbara, Corsica 10 11/09/2003) added blindly in the samples. Cat stands for *C. cataneii*, *gejelensis*, cir for *C. circumscriptus*, fes for *C. festivipennis*, flavi for *C. flavipulicaris*, gri for *C. griseidorsum*, het for *C. heteroclitus*, imi for *C. imicola*, jum for *C. juminerikurensis*, kibu for *C. kibumensis*, lup for *C. lupicaris*, lon for *C. longipennis*, mal for *C. malevillei*, mar for *C. maritimus*, new for *C. newsteadi*, Obs for *Obsoletus* complex, par for *C. parroti*, pic for *C. picturatus*, puli for *C. pulicaris*, puncta for *C. punctatus*, puncti for *C. puncticollis*, saha for *C. sahariensis*, sha for *C. shaklawensis*, subm for *C. submaritimus*, subf for *C. subfagineus*, spp for *C. spp.*

plasmids per specimen were kept for further analysis. The plasmid DNA was extracted using plasmid DNA preparation kit (Nucleospin® Plasmid, Macherey Nagel, USA). A BamHI (Biolabs, UK) restriction endonuclease digestion and quantification of plasmid copies was performed by the determination of DNA concentration at a 280 nm wavelength. Aliquots of this plasmid, stored at -80°C were used for the establishment of a reproducible standard curve run in each plate.

2.4. *C. imicola* ss ITS-1 quantitative PCR amplification

The quantitative PCR was carried out using the Mx3000P System with a SYBR Green I detection method (Stratagene, France). Amplification was performed in a total volume of 20 μl consisting of 2x PCR reaction buffer (Stratagene, France), 300 nM of each primer (PanCulR-5'-TGCGGTCTTCATCGAACCCAT-3'/Cul-*imicola*-5'-TTACAGTGGCTTCGGCAAG-3') under the following cycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min; then 40 cycles at (94°C , 1 min; 62°C , 1 min; 72°C , 30 s) and a final dissociation phase. 1 μl of DNA previously diluted 1:10 was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. The plasmid PCR-blunt-*C. imicola* ss ITS-1 construct was used in serial dilutions as a standard curve. Results were expressed in Ct values and the Ct values were determined at a preset threshold. The Cycle threshold (Ct) value indicated the cycle where fluorescence detected from amplification on the target gene exceeded the preset threshold.

2.5. Conventional cytochrome oxidase specific and *C. imicola* ss specific PCR amplification

To control the quality of DNA extracted from the trap catches, a conventional PCR based on cytochrome oxidase

was performed. In addition, a conventional PCR specific of *C. imicola* ss ITS-1 was included to assess the performances of the real-time PCR assay. Both conventional PCR reactions were performed in a total volume of 50 μl consisting of 10xPCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 250 μM of dNTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer (COX-F-5'-CAGGTAAAATTTAAATATAAACTTCTGG-3'/COX-R-5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT-3') (Simon et al., 1994) for the cytochrome oxidase PCR and PanCulR/Cul-*imicola* for the *C. imicola* ss PCR (Cêtre-Sossah et al., 2004), and 2.5 U Taq DNA polymerase under the following thermocycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min; then 30 cycles at (94°C , 1 min; 58°C , 1 min; 72°C , 1 min) and a final extension phase at 72°C for 10 min. A volume of 1 μl of genomic DNA diluted 1:10 was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide.

2.6. Data analysis

A receiver operating characteristic (ROC) analysis (Zweig and Campbell, 1993) was performed to assess the performances of the *C. imicola* ss real-time PCR test that could be considered as a diagnostic and surveillance tool. In such analyses, the accuracy of a dichotomous screening test is quantified by comparing the results of the test with those of a gold standard test for the identification of *Culicoides* species. A gold standard is an absolutely accurate test used to assess the real presence of the item to be detected (Greiner et al., 2000). In our study, the true identification of *Culicoides* was performed by a microscopy examination and was considered as our gold standard. The result of the ROC analysis is a plot with sensitivity in the y-axis and (1-specificity) in the x-axis for each possi-

ble cut-off value of the studied test. The closer the ROC curve progresses to the top-left corner of the graph, the better the ability of the test discriminates between the absence and presence of *Culicoides*. Given equal costs to test results errors, the optimal cut-off point is the one with maximum sensitivity (se) and specificity (sp) (Greiner, 1995), which occurs at the point where the curve gets the closest to the top-left corner of the plot. All statistical analyses were carried out with intercooled Stata 8 software. Sensitivity and specificity were estimated by using “diag” stata command. Ninety-five percent confidence intervals (CI 95%) were provided assuming a binomial distribution.

3. Results

3.1. Linearity of the real-time PCR method

A standard curve was generated by measuring the crossing point of each standard and plotting against the logarithm of concentration, using the Mx3000P program (Stratagene, France). The standard curve was linear over the entire quantification range and resulted in an error of less than 1.0 with a linear regression value r^2 of 0.999, indicating a strong correlation between the ranges used from 10^{-2} to 10^{-8} ng (Fig. 1). The melting temperature T_m of the PCR products generated from the standard and the samples was approximately 77 °C with a reaction efficacy of 96.5%. No non-specific amplification was observed in any of the samples. The real-time PCR protocol was then evaluated by testing DNA extractions from trap catches.

3.2. Sensitivity and specificity

3.2.1. Sensitivity

The quantitative real-time PCR method was evaluated by testing DNA extracted from light trap catches collected in Southern France. The 100 light trap catches were first analyzed by the microscopy method, considered as gold standard and no specimens of *C. imicola* ss were detected except for one trap catch where one single specimen of *C. imicola* ss was identified (last row of the Table 1). Either 1 or 5 specimens of *C. imicola* ss were randomly added in 40 of these 99 samples. In order to evaluate the quality of the DNA extraction, a cytochrome oxidase specific conventional PCR assay was performed on the 100 extracted samples and revealed a positive amplification with a specific band at the right size around 500 bp for the total number of samples (data not shown).

An attempt to determine the presence/absence of *C. imicola* ss specimens was made based on the cycle threshold (Ct) value, which indicates the cycle where fluorescence detected from amplification on the target gene exceeded the preset threshold. Within each qPCR run, a plasmid standard curve was included. To correct for minor changes in amplification efficiency between PCR runs, the Ct values estimated for the samples for any given 96-well plates were interpolated in their companion standard curve with Ct values given at the same preset threshold.

The distribution of the Ct values of negative versus positive samples in Fig. 2 allowed the determination of a cut-off value at 30.5. The number of positive samples with different amounts of *C. imicola* (21 with one specimen and 20 with

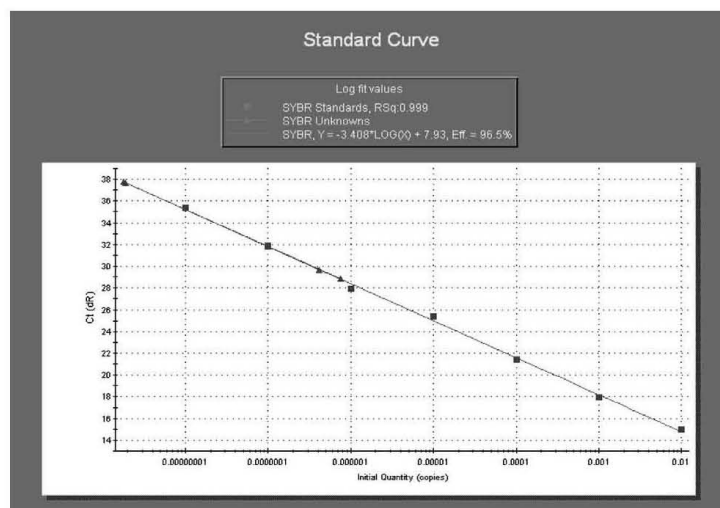


Fig. 1. Linear regression of the plasmid PCR-blunt-ITS-1 standard ranging from 1 fg to 10 pg was determined using fit points analysis method. The standard curve showed a regression coefficient $r = 0.999$, mean squared error, efficacy of 96.5% and slope = -3.408 . Each point of the curve represents the average value (SEM) of three independent qPCR reactions. It represents cycle numbers in y-axis and ng quantities in x-axis.

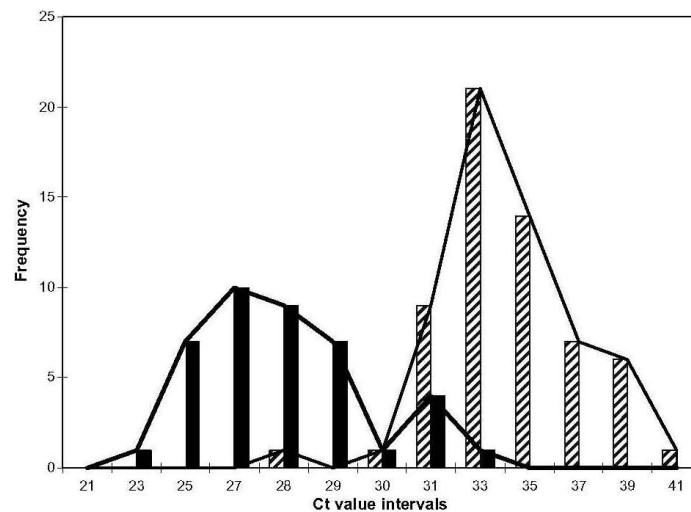


Fig. 2. Distribution of the Ct value of 100 light trap catches samples from a French BT-free area collected in 2004.

five specimens) was not sufficient to give clear different Ct values. The results obtained by real-time PCR were compared with those of the gold standard (microscopy method). By microscopic examination, all reconstituted trap catches containing 1 or 5 specimens of *C. imicola* ss were detected while the 59 other trap catches were found negative. Two positive trap catches were not detected by real-time PCR whereas 5 negative trap catches were unduly scored positive by PCR. When correlating the Ct values obtained from the real-time PCR with the microscopy method, all 39 samples found positive by microscopy had Ct values between 22.5 and 30.5 while the 54 samples found negative by microscopy value were higher than 30.5.

As mentioned in Table 2, 39 out of 41 samples were positive by both the real-time PCR screening method and the microscopy whereas 54 samples were negative by both methods giving a concordance rate of 93% between microscopy and ITS-1 real-time PCR. The sensitivity and specificity of the real-time PCR were 95% and 92%, respectively. The Cohen's κ -coefficient, taking into account both the percentage of agreement and the percentage of agreement

expected by chance was 0.8361 and therefore was considered as very good (Altman, 1991; Jakobsson and Westergren, 2005).

These 100 samples were included in the ROC analysis (Fig. 3), the area under curve was 0.9752 (between 0.7634 and 0.9721 with a 95% confidence interval, CI). The cut-off point to which sensitivity and specificity were optimal was for a Ct value of 30.5. The sensitivity of the test for this cut-off was 95% (95% CI: 0.8824–1.0) and the specificity was 92% (95% CI: 0.8241–0.9759).

The contingency table (Table 3) presenting the conventional *C. imicola* ss specific PCR assay data versus the morphological data was performed on those 100 samples and specificity/sensitivity percentages assessed. A sensitivity of 97.5% (95%CI: 0.9266–1.0) and a specificity of 97%

Table 2
Distribution of the results of the *C. imicola* ITS-1 screening real-time PCR versus morphological determination for one hundred light traps samples containing either 1 or 5 *C. imicola* within thousands of others insects

		Morphology		
		Positive	Negative	Total
Real-time PCR	Positive	39	5	44
	Negative	2	54	56
	Total	41	59	100

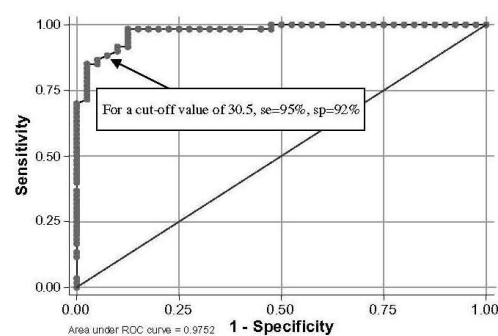


Fig. 3. Results of real-time PCR ROC analysis when the morphological determination is used as the gold standard method.

Table 3

Distribution of the results of the *C. imicola* ITS-1 conventional PCR versus morphological determination for one hundred light traps samples containing either 1 or 5 *C. imicola* within thousands of others insects

		Morphology		Total
		Positive	Negative	
Conventional PCR	Positive	40	2	42
	Negative	1	57	58
	Total	41	59	100

(95%CI: 0.8948–1.0) were found with a concordance rate of 0.97 between the conventional PCR and morphology. These results showed that the conventional PCR generated half less false negative and positive results than the real-time PCR.

3.3. Quantification of *C. imicola* ss specimens

Since the samples caught for BT vector surveillance are made of *Culicoides* genus insects and of many other insect families, the analytical sensitivity of the real-time PCR (e.g. the minimal number of *C. imicola* detectable) was evaluated with the aim not only to detect at least one single specimen of *C. imicola* ss but also to quantify the number of *C. imicola* ss within a pool of other insects. When correlating the Ct values with the number of *C. imicola* ss introduced in the samples, a linear regression of 0.9702 was found (Fig. 4), indicating a strong correlation between the amount of *C. imicola* ss specimens in trap catches and the Ct values. The assays repeated in triplicates are highly reproducible with SD values very low (for 10 specimens of *C. imicola* ss, mean of Ct value: 24.13, SD: 0.83; for 50 specimens, mean of Ct value:

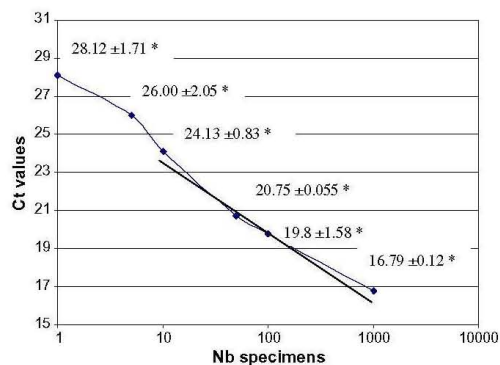


Fig. 4. Linear regression of the number of *C. imicola* ss specimens with the Ct values obtained from the real-time PCR method. The standard curve showed a regression coefficient $r^2 = 0.97$, mean squared error with the equation: $y = -1.5663 \ln(x) + 27.21$ (without the values of the mean for one specimen and with five specimens). The average values (SEM) and SD from three independent qPCR reactions are shown (*).

20.75, SD: 0.055; for 100 specimens, mean of Ct value: 19.8, SD: 1.58; for 1000 specimens, mean of Ct value: 16.79, SD value: 0.117).

4. Discussion

The development of the real-time PCR method was performed in order to settle a rapid, sensitive and specific diagnostic tool using one of the most safe and reliable techniques. The aim of this study was to setup a quantitative test for the diagnosis of *C. imicola* ss amongst a pool of insects collected in areas at risk for *Culicoides*-borne diseases such as BT and AHS and where entomosurveillance is therefore needed. The choice of the morphological determination as a reference test is justified even if both PCR methods (conventional and real-time) are concordant and gave similar levels of sensitivity (respectively, 97.5% and 95%) and specificity (respectively, 96% and 92%) with equivalent concordance rate (0.97 versus 0.93). With the real-time PCR method, the difference in Ct values in samples containing one specimen or samples containing five specimens of *C. imicola* ss was not possible; samples with five specimens could give Ct values below samples with only one specimen. For this reason it was decided that interpretation of the data with a common Ct value for positive samples containing either 1 or 5 specimens was performed. A corresponding Ct value of 30.5 was chosen and therefore gave a relatively high sensitivity of 95% and a specificity of 92%. The main advantages of the real-time PCR method is both the quantification of specimens present in trap catches and the high throughput of this method in the framework of an entomosurveillance network in *C. imicola* ss infested and free areas. Although the difference between samples containing 1 and 5 *C. imicola* ss in the trap catches were hardly distinguished by the real-time PCR, a clear distinction between 10, 50, 100 and 1000 specimens could be achieved. In terms of surveillance programs, the difference between 1 or 5 specimens of *C. imicola* ss on one site during one night does not have relevant importance but the ability to quantify 5, 10, 50, 100 or 1000 specimens can definitely help for risk assessment and control measures that need to be undertaken in the settlement of a population in a BT-free area or to follow the population dynamics in a previously affected area whereas the conventional PCR could not make the difference at that point. A qualitative detection of *C. imicola* ss could be performed first by a conventional PCR assay followed by a quantification on the positive samples by real-time PCR. The large scale applications of this technique for research are also interesting. For example, little is known on the breeding sites of *Culicoides* vectors within the farming environment and the morphological discrimination of the different *Culicoides* species is very hard at the larval stage due to the tedious nature of microscopy difficulties of the observation and the lack of description. Larvae identification by this

molecular tool has already been successfully performed (data not shown) and will help for ecology-based research. Large scale studies should therefore be undertaken using real-time quantitative PCR to identify breeding sites in the farming environment which are implicated in the spread of the vectors and the disease.

5. Conclusion

Since the microscopy method is well described and currently used as the gold standard for identifying different species of *Culicoides* based on wing patterns, real-time PCR advantages such as its low cost, high throughput, sensitivity and specificity lead to the conclusion that this test can be suitable for screening large numbers of trap catches samples in a short period of time as requested in surveillance programs whereas the gold standard is still required for the identification of species that are new or that were not already described in the studied area such as Palaearctic species that are suspected to be competent vectors in Europe. Its performance in terms of diagnostic tool need to be pointed out but also its use to help to characterize *Culicoides* larvae should become integral part of ecology-based research studies in order to attempt the development of vectors control methods. Real-time PCR for other competent vectors can be developed using the same strategy.

Acknowledgements

Part of the project was funded by the French Ministry of Agriculture – DGAl and the EPIZONE network of excellence (Contract 016236).

References

- Altman, D.G., 1991. Practical Statistics for Medical Research. Chapman and Hall, London, UK.
- Anon, 2006. Vector of bluetongue. Vet. Rec. 159, 575.
- Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., De La Rocque, S., Roger, F., 2004. Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. Vet. Ital. 40 (3), 226–231.
- Baldet, T., Mathieu, B., Delécolle, J.C., Gerbier, G., Roger, F., 2005. Emergence de la fièvre catarrhale ovine dans le bassin méditerranéen et surveillance entomologique en France. Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux 58 (3), 125–132.
- Baylis, M., 2002. The re-emergence of bluetongue. Vet. J. 164, 5–6.
- Baylis, M., Mellor, P.S., 2001. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. Vet. Rec. 149, 659.
- Beckenbach, A.T., Borkent, A., 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. Mol. Phylogenet. Evol. 27, 21–35.
- Borkent, A., Wirth, W.W., 1997. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, No 233, p. 257.
- Campbell, J.A., Pelham-Clinton, E.C., 1960. A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). Proc. R. Soc. Edinb. B 67, 181–302.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., Albina, E., 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. Vet. Res. 35, 325–337.
- Delécolle, J.C., 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. PhD Dissertation. U.F.R. Sciences de la Vie et de la Terre, Université Louis Pasteur de Strasbourg I No. 293, p. 238.
- Delécolle, J.C., De La Rocque, S., 2002. Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). Bulletin de la Société Entomologique Française 107, 371–379.
- Greiner, M., 1995. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. J. Immunol. Methods 185, 145–146.
- Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the ROC analysis for diagnostic tests. Prev. Vet. Med. 45, 23–41.
- Holmes, I.H., Boccardo, G., Estes, M.K., Furuichi, M.K., 1995. Family *Reoviridae*. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial S.A. (Eds.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien, NY, pp. 208–239 (Archives of Virology Supplementum 10).
- Jakobsson, U., Westergren, A., 2005. Statistical methods for assessing agreement for ordinal data. Scand. J. Caring Sci. 19, 427–431.
- Li, G.Q., Hu, Y.L., Kanu, S., Zhu, X.Q., 2003. PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. Vet. Parasitol. 112, 101–108.
- Linton, Y.M., Mordue Luntz, A.J., Cruickshank, R.H., Meiswinkel, R., Mellor, P.S., Dallas, J.F., 2002. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. Med. Vet. Entomol. 16, 139–146.
- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., Cêtre-Sossah, C., 2007. Molecular identification of the Western European species of the *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1 rDNA multiplex PCR assay. J. Med. Entomol. 44 (6), 1019–1025.
- Meiswinkel, R., 1989. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 56, 23–39.
- Meiswinkel, R., 2006. The *Culicoides* vector of bluetongue disease in Limburg, the Netherlands. Bluetongue Europe (14): New Vector Post. <<http://www.promedmail.org>> (Date: Mon 23 Oct, 2006).
- Meiswinkel, R., Gornulski, L.M., Delécolle, J.-C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes unfinished business. In: MacLachlan, N.J., Pearson, J.E. (Eds.), Bluetongue, Part I. Proceedings of Third International Symposium, Taormina, 26–29 October 2003. Vet. Ital. 40, pp. 151–159.
- Mellor, P.S., 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 162, 143–161.
- Mellor, P.S., Wittmann, E.J., 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. Vet. J. 164, 20–37.
- Perrin, A., Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., 2006. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS-1 rDNA sequences. Med. Vet. Entomol. 20, 219–228.
- Purse, B.V., Nedelchev, N., Georgiev, G., Veleva, E., Boorman, J., Denison, E., Veronesi, E., Carpenter, S., Baylis, M., Mellor, P.S., 2006. Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. Med. Vet. Entomol. 20 (3), 335–344.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Fook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87, 651–701.

- Tatem, A.J., Baylis, M., Mellor, P.S., Purse, B.V., Capela, R., Pena, I., Rogers, P.J., 2003. Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. *Vet. Microbiol.* 97, 13–29.
- Thiry, E., Saegerman, C., Guyot, H., Kirten, P., Losson, B., Rollin, F., Bodmer, M., Czaplicki, G., Toussaint, J.F., De Clercq, K., Dochy, J.M., Dufey, J., Gilman, J.L., Messemann, K., 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet. Rec.* 59, 327.
- Verwoerd, D.W., Erasmus, B.J., 1994. Bluetongue. In: Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.). Oxford University Press, Capetown (RSA), pp. 443–459.
- Wittmann, E.J., Mellor, P.S., Baylis, M., 2001. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique et Technique (OIE)* 20, 731–740.
- Zientara, S., Grillet, C., De La Rocque, S., Gourreau, J.M., Gregory, M., Diallo, A., Hendricks, P., Libeau, G., Sailleau, C., Albina, E., Breard, E., Delécolle, J.C., 2001. La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001. *Epidémiologie en Santé Animale* 40, 129–137.
- Zweig, M.H., Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.

VECTOR CONTROL, PEST MANAGEMENT, RESISTANCE, REPELLENTS

Molecular Identification of Western European Species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an Internal Transcribed Spacer-1 rDNA Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay

BRUNO MATHIEU,¹ AURÉLIE PERRIN,² THIERRY BALDET,² JEAN-CLAUDE DELÉCOLLE,³
EMMANUEL ALBINA,² AND CATHERINE CÊTRE-SOSSAH^{2,4}

J. Med. Entomol. 44(6): 1019–1025 (2007)

ABSTRACT In southern Europe, orbiviral diseases such as bluetongue (BT) have been assumed to have been largely transmitted by the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). Recent outbreaks have occurred in regions where *C. imicola* is normally absent, supporting the theory that other species belonging to the *Obsoletus* or *Pulicaris* complexes may play a role in BT virus transmission. Investigations of the ecology of the species within the former group are hampered by females of member species being extremely difficult to separate by classical morphology. To allow straightforward separation of these species in France, a multiplex polymerase chain reaction-based on internal transcribed spacer (ITS)-1 rDNA was developed to distinguish between *Culicoides chiopterus* Meigen, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *Culicoides montanus* Shakirjanova, *Culicoides obsoletus* Meigen, and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle. This tool will be useful in defining both the vector role and larval biotopes of these species in Europe.

KEY WORDS BTV, molecular phylogeny, *Culicoides*, *Obsoletus* complex

The genus *Culicoides* Latreille is currently represented by some 1,254 species (Beckenbach and Borkent 2003) and includes several complexes of sibling species that are difficult to separate by classical morphology. Correct identification of these species, however, is essential for the understanding of disease epidemiology, particularly when only few of the species in the complex have been implicated in disease transmission.

Bluetongue (BT) and African horse sickness are infectious arthropod-borne viral diseases caused by viruses belonging to the genus *Orbivirus* within the family *Reoviridae* and they are transmitted by certain species of biting midges belonging to the genus *Culicoides* (Holmes et al. 1995). In the eastern Mediterranean Basin, outbreaks where the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer has never been detected during insect surveys have been reported in Bulgaria, Serbia, Kosovo, Croatia, Montenegro, northern Greece, Bosnia Herzegovina, and more recently in Belgium, Germany, Holland, and France (Baylis and Mellor 2001, Mellor and Wittmann 2002, Purse et al. 2005, Meiswinkel 2006).

There are indications that species of the *Obsoletus* and/or *Pulicaris* complexes may play a role in bluetongue virus (family *Reoviridae*, genus *Orbivirus*, BTV) transmission. Indeed, species belonging to both complexes are present in large numbers in areas of BT transmission where *C. imicola* is not present. In addition, BTV was isolated from specimens belonging to these complexes during outbreaks in Cyprus, Italy (Mellor and Pitzolis 1979; Savini et al. 2003, 2005; Caracappa et al. 2003) and northern Europe (Meiswinkel 2006, Thiry et al. 2006). Moreover, oral susceptibility to BTV serotype 9 has recently been demonstrated from specimens belonging to *Obsoletus* and *Pulicaris* complexes (Carpenter et al. 2006), species widespread and abundant in the region and across most of northern Europe.

Culicoides chiopterus Meigen, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *Culicoides montanus* Shakirjanova, *Culicoides obsoletus* Meigen, and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle are usually referred to collectively as *Obsoletus* complex (Carpenter et al. 2006). Together with *C. imicola*, these five species are the only representatives of the subgenus *Avaritia* in France and western Europe. *C. obsoletus* and *C. scoticus* are found frequently in Bulgaria (Glouhova et al. 1991), northern Spain (Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003), and Italy (Savini et al. 2003). Very little information is available for the three other species belonging to the *Obsoletus* complex. Unfortunately, adult females of most of the five species belonging to the *Obsoletus*

¹ Entente InterDépartementale pour la démoustication, 165 Avenue Paul Rimbaud, 34184 Montpellier Cedex 4, France.

² CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

³ Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée Zoologique, 29 Bd de la Victoire, 67000 Strasbourg, France.

⁴ Corresponding author, e-mail: catherine.cetre-sossah@cirad.fr.

Table 1. Collection of *Culicoides* species used in this study for genomic DNA extraction and multiplex PCR amplification

<i>Culicoides</i> species	Collection locality	Geographic coordinate ^a	Collection date	Total no. of specimens	Homologies (%)
<i>C. chiopterus</i>	Geispolsheim	7° 38' 03" E, 48° 29' 35" N	3–4 June 2002	3	98.93
<i>C. dewulfi</i>	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	28–29 July 2004	1	99.10
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	7 May 2005	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	15 May 2005	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	17–18 Aug. 2004	1	
<i>C. montanus</i>	Cargèse	8° 37' 48" E, 42° 8' 57" N	17–18 Aug. 2004	1	98.47
	Fozzano	9° 00' 20" E, 41° 41' 22" N	17–18 June 2005	2	
<i>C. obsoletus</i>	Argelès sur mer	3° 3' 6" E, 42° 31' 31" N	24–25 July 2003	1	99.43
	Castelet	5° 45' 31" E, 43° 12' 16" N	24–25 Oct. 2002	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	24–25 Oct. 2002	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	28–29 June 2004	2	
<i>C. scoticus</i>	Roquette-sur-siagne	6° 56' 7" E, 43° 34' 38" N	8–9 Aug. 2003	1	98.33
	Roquette-sur-siagne	6° 56' 7" E, 43° 34' 38" N	8–9 Aug. 2003	1	

^a Longitude/latitude, UTM WGS 84.

complex are morphologically similar and relatively difficult to distinguish. Males are usually distinguishable on the basis of certain characteristics of the genitalia (Kremer and Rebholz 1977, Delécolle 1985, Rawlings 1997), with few exceptions (Gomulski et al. 2005).

Due to similar difficulties in identification, the larval habitats used by members of the Avaritia group are not well characterized in Europe, although a general association with the farm habitat has been made in some cases (Kettle and Lawson 1952, Chaker and Kremer 1983, Hill 1947).

The identification of techniques that allow the swift and accurate taxonomic separation of the *Obsoletus* complex would assist both the identification of differences in adult ecologies within the group, with subsequent value for epidemiological studies of virus transmission, and additionally allow the identification of larvae without the need for successful rearing for identification purposes. The present work, based on previous studies about the development of diagnostic assays and phylogenetic analysis (Li et al. 2003, Cêtre-Sossah et al. 2004, Perrin et al. 2006) describes a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay based on internal transcribed spacer (ITS)-1 rDNA to distinguish adults of species belonging to the *Obsoletus* complex (*C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*).

Materials and Methods

Study Site. Based on the data collected in 2002 by the *Culicoides* surveillance network implemented in mainland France (Baldet et al. 2004), a sheep farm located 2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N and known to support large numbers of midges of the *Obsoletus* complex was selected to provide individuals for analysis. Because a bivoltine activity of the adults of the *Obsoletus* complex species was observed similar to that of other Mediterranean countries (Calistri et al. 2003, Capela et al. 2003, Miranda et al. 2003, Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003), most of the three specimens for each species were collected in spring and early autumn from geographically distinct populations (except for *C. dewulfi*) (Table 1).

Adult *Culicoides* samples used in this study were collected as described previously (Cêtre-Sossah et al. 2004). Identification of *Culicoides* was initially based upon the wing pattern and subsequently confirmed by mounting some specimens on microscope slides (Kremer 1965, Wirth and Marston 1968). The samples were identified morphologically and independently by two of us (B.M. and J.-C.D.) by using the keys of Campbell and Pelham-Clinton et al. 1960 and Delécolle 1985.

C. montanus and *C. chiopterus* were sequenced from female specimens stored in ethanol, whereas *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* were sequenced from male specimens. A xylene bath was used to extract female specimens of *C. dewulfi* from slides after identification.

Genomic DNA Extraction and Multiplex PCR Amplification. Three specimens of each *Culicoides* species were used for the DNA extraction (Table 1) with the DNeasy tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

The gene analysis software Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to compare the ITS-1 rDNA sequences of the five species of the *Obsoletus* complex for the design of primers. Table 2 lists the sequences of the six different primers used for the multiplex PCR. The five reverse diagnostic primers were designed to be used in the multiplex PCR with the Pan Cul-Forward primer (PanCulF), located in one of the most highly conserved regions (Cêtre-Sossah et al. 2004) to give a specific pattern of each of the species.

Reactions were performed in a total volume of 25 µl consisting of 10× PCR reaction buffer; 1.5 mM MgCl₂; 250 µM each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Eurobio, Les Ulis, France); 20 pmol of the primers Obs-ss-R, Obs-sl-R, Dewulfi-R, and Chiopterus-R; 40 pmol of Montanus-R; 60 pmol of Pan CulF; and 2.5 U of TaqDNA polymerase. A volume of 1 µl of genomic DNA was added to each PCR reaction, and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carryover contamination. PCR was carried out with the following cycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min and then 30 cycles at 94°C, 1 min; 61°C, 1 min; 72°C, 1 min and a final extension phase at 72°C for 10 min. PCR products were

Table 2. Nucleotide sequence of the *Obsoletus* complex multiplex PCR primers

Primer ^a	Length (bases)	Tm value (°C)	Sequence
PanCulF	20	53.6	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'
Obs-sl-R	21	55.6	5'-TGAATCACAGCACCCGCTTAA-3'
Obs-ss-R	30	55.7	5'-ATCTTGATAAAAAATCAATGCATCTCAGT-3'
Dewulfi-R	36	54.7	5'-CACACCATACACTATATAAGAATACATCATTTATATT-3'
Montanus-R	20	59.2	5'-CGAGCTGCAATGCCAATGA-3'
Chiopterus-R	21	56.4	5'-CGAGCTGCTATACCGAAGCAT-3'

^a sl, sensu lato; ss, sensu stricto.

examined by electrophoresis in a 2.5% agarose gel with 0.0625% ethidium bromide.

The 30 species used for the specificity of the *Obsoletus* complex specific PCR assay were the following: *C. ach-rayi* Kettle & Lawson, *C. cataneii* Clastrier, *C. circumscriptus* Kieffer, *C. dendriticus* Boorman, *C. derisor* Callot & Kremer, *C. fagineus* Edwards, *C. festipennis* Kieffer, *C. gejelensis* Dzhaifarov, *C. griseidorsum* Kieffer, *C. heteroclitus* Kremer & Callot, *C. imicola* Kieffer, *C. indistinctus* Khalaf, *C. kibunensis* Tokunaga, *C. kurensis* Dzhaifarov, *C. longipennis* Khalaf, *C. lupicaris* Downes & Kettle, *C. malevillei* Kremer & Coluzzi, *C. maritimus* Kieffer, *C. maritimus* variety *paucisensillatus* Callot, Kremer & Rioux, *C. newsteadi* Austen, *C. pallidicornis* Kieffer, *C. parroti* Kieffer, *C. pictipennis* Staeger, *C. picturatus* Kremer & Deduit, *C. pulicaris* Linné, *C. punctatus* Meigen, *C. puncticollis* Becker, *C. sahariensis* Kieffer, *C. subfagineus* Delecolle & Ortega, and *C. submaritimus* Dzhaifarov.

Cloning and Sequencing of the ITS-1 Fragments. The purified PCR product was cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR cloning kit; Invitrogen), by using chemically competent *Escherichia coli*. To confirm the presence of the insert, PCR amplification with PanCulF/PanCulR primers was performed on 10 bacterial clones for each species. Three clones per specimen were kept for further analysis. The plasmid DNA was extracted using Plasmid DNA preparation kit (Nucleospin R Plasmid, Macherey Nagel, Easton, PA). Three clones for each of the three *Culicoides* specimens per species were sequenced with both PanCulF and PanCulR primers. An ITS-1 sequence was obtained for each single biting midge by alignment of the forward and reverse sequences.

Sequence Analysis and Alignment. A consensus ITS-1 sequence was generated from the nine different sequences obtained for each species (three distinct specimens with three clones for each specimen). The consensus sequences were submitted to GenBank with an appropriate accession number: *C. chiopterus*, DQ408543; *C. dewulfi*, DQ408545; *C. montanus*, DQ408544; *C. obsoletus*, AY861152; *C. scoticus*, AY861160; *C. imicola*, AY861144; and *C. newsteadi*, AY861151. This consensus sequence was used for the phylogenetic analysis.

The alignment of the forward and reverse sequences was performed using Vector NTI software (Invitrogen). Sequences from different midges were aligned using Clustal W (Thompson et al. 1994) included in Vector NTI, and base differences between sequences were identified. All sequences were aligned

without gaps. The identity of all polymorphic bases was checked against the original chromatograms. Intraspecific variation was found to be very low.

Phylogenetic Analysis. The alignment file format msf (*.msf) obtained after alignment by Vector NTI was converted into a phylip 3.2 format (*.phy) by using Bioedit software to allow phylogenetic analysis (Hall 1999). Neighbor-joining and Bayesian inference tree construction were used to test the robustness of phylogenies.

Phylogenetic analysis was first carried out using the neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) method with Darwin software (Perrier et al. 2003). Distances were adjusted for multiple substitutions using Jukes and Cantor correction and generated with TreeCon MATRIXW program of Darwin (Van de Peer and De Watchter 1993). Bootstraps were determined on 2000 replicates.

Bayesian inference was performed using MrBayes version 3.0B4 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with random starting trees and run for 2,000,000 generations, sampling the Markov chains at intervals of 100 generations. Four heated Markov chains (using default heating values) were used. In total, 1,000 of the 20,000 resulting trees were discarded as "burn-in." Support for tree nodes was determined based on the values of bayesian posterior probability obtained from a majority-rule consensus tree. The analysis was repeated five times to confirm that the results converged to the same topology. The complete ITS-1 sequence of *C. newsteadi* (GenBank accession no. AY861151) was used as an outgroup.

Results and Discussion

Alignment of the ITS-1 rDNA of the Five Species Belonging to the *Obsoletus* Complex. Three specimens of each species taken from geographically separated sites (with the exception of the *C. dewulfi* samples, which came from a single site) were analyzed (Table 1) and formed distinct clusters.

The percentage of homology for each species *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus* was 98.93, 99.1, 98.47, 99.43, and 98.33, respectively, indicative of high sequence homologies within species. This observation had been already made on three specimens of *C. imicola* (99.8% homology) in a phylogenetic study published previously (Perrin et al. 2006). These high intraspecific homologies confirm that ITS-1 region, highly conserved among species trapped in different locations (except *C. dewulfi*

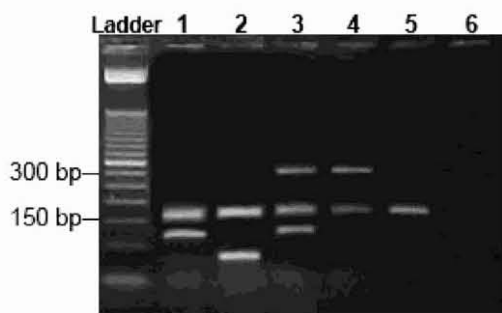


Fig. 1. Multiplex PCR analysis of adult *Culicoides* samples. Amplification of the ITS-1 of the five *Obsoletus* complex species. Ladder is a 50-bp DNA ladder (Invitrogen). Lanes 1–6 correspond to *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*, respectively. *C. imicola* is the negative control.

where all the specimens were captured in the same location), is useful for the development of a molecular detection tool and for phylogenetic analysis. The alignment of the ITS-1 sequences revealed three highly conserved regions, between 2 and 41 bp, 174 and 230, and 360 and 404 bp, respectively. In two of these highly conserved regions, two primers, PanCulF and Obs-sl-R, were designed and enabled the amplification of a common *Obsoletus* complex-specific band of around 160 bp present for the five species of the *Obsoletus* complex. Other variable regions were located at different positions in the sequences within the species (50–80, 95–120, and 260–300 bp), these regions were respectively used to design species-specific primers (Dewulfi-R primer for the positions 50–80 bp, Montanus-R and Chiopterus-R primers for the positions 95–120 bp, and Obs-ss-R primer for the positions 260–300 bp). Although these samples were adequate to describe the French fauna, further samples from a wider geographic area would provide an interesting comparison of any intraspecific variation.

Molecular Detection of the *Obsoletus* Complex Species by Specific Multiplex PCR. To develop a specific molecular tool to distinguish the five species belonging to *Obsoletus* complex, preliminary PCR reactions were performed on adult specimens. Agarose gel electrophoresis showed highly specific PCR products for each of the species (Fig. 1). An *Obsoletus* complex-specific band was observed as a common band for the five species of the *Obsoletus* complex at ≈166 bp. Additional bands leading to a specific pattern were amplified for the four other species. Only one additional, and specific, band was present at 78, 117, and 302 bp, respectively, for *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, and *C. obsoletus*. For *C. montanus*, two specific amplified products at 125 and 302 bp were obtained. *C. scoticus* was the only species to be identified by the presence of the unique common band at 166 bp. As expected, no band was detected in the negative control (*C. imicola*) (Fig. 1, lane 6). The absence of the common *Obsoletus* complex species-specific band at ≈170 bp excluded the presence of an *Obsoletus* com-

plex specimen in the samples. Additionally, none of the other commonly found species tested as part of standardizing the assay produced cross-reactions.

A specific molecular tool for the individual detection of the five species of the *Obsoletus* complex was thus developed with adult specimens. This method also can potentially be used to identify larval specimens and preliminary experiments have been encouraging (data not shown). In future studies, collection of a high number of adults specimens and single larvae in different sites with measurements of physical and chemical characteristics of soils (e.g., pH, conductivity and percentage of organic matter) will help to better characterize *Obsoletus* complex species biotopes. Species identification at the larval stage would allow a more thorough understanding of BT vector ecology.

Phylogenetic Status of *Avaritia* Subgenus Species Based on ITS-1 Sequences. We used the ITS-1 sequences of the *Obsoletus* complex species already published in GenBank (*C. obsoletus* and *C. scoticus*), the newly sequenced species generated in our laboratory (*C. dewulfi*, *C. chiopterus*, and *C. montanus*), and *C. imicola* (AY861144). Phylogenetic trees generated using neighbor-joining (Fig. 2A) and Bayesian inference (50% majority rule consensus tree; Fig. 2B) gave similar data.

The specimens belonging to the six species examined were grouped into five clusters by phylogenetic analysis. The first cluster includes both *C. obsoletus* and *C. montanus* and is supported by a 100% bootstrap value. Divergence between *C. obsoletus* and *C. montanus* is in turn supported with a bootstrap value of 63%. The four other clusters were monospecific, with *C. chiopterus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, and *C. imicola*. For these species, each cluster is supported by a 100% bootstrap value. Among the *Obsoletus* cluster complex, the *C. dewulfi* cluster is found closer to the *C. imicola* cluster. This phylogenetic proximity may explain the recent implication of *C. dewulfi* in The Netherlands outbreak (Meiswinkel 2006).

These results confirm a previous study on ITS-2 rDNA phylogenetic of *Obsoletus* complex where topologies on trees generated were similar where four distinct clusters were apparent, the first of which includes both *C. obsoletus* and *C. montanus*, whereas the others are formed by *C. scoticus* (89% bootstrap value), *C. dewulfi* (100% bootstrap value), and unidentified species A and B, respectively (Gomulski et al. 2005). This study provided no evidence, however, of subgroup discrimination between the *C. scoticus* and *C. dewulfi* species as found for the ITS-2 analysis. However, a significant bootstrap value higher than 50% was not obtained for ITS-2 to separate *C. obsoletus* and *C. montanus*. Gomulski et al. 2005 expressed a doubt upon identification of *C. montanus* captured in Italy because they did not find their specimen in altitude exceeding 2,000 m where this species was originally captured and described (Pamir, Tajikistan). Our specimens of *C. montanus* also were not trapped in France at this altitude. The confirmation of the close position between *C. obsoletus* and *C. montanus* and the significant bootstrap value between each other lead us to think

November 2007

MATHEU ET AL.: MOLECULAR IDENTIFICATION OF OBSOLETUS COMPLEX

1023

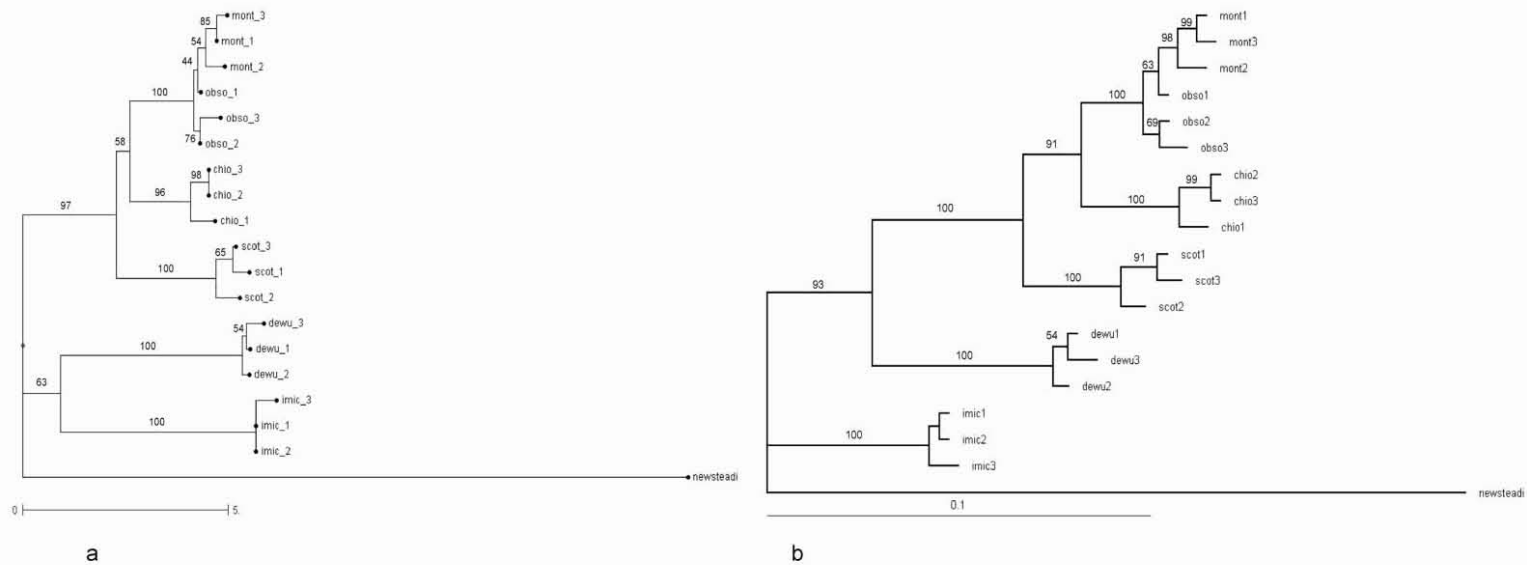


Fig. 2. Phylogenetic relationships among ITS-1 sequences of *Obsoletus* complex species, chio, dewu, imic, mont, obso, and scot stand, respectively, for *C. chiopteris*, *C. dewulfi*, *C. imicola*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*. (A) Neighbor-joining tree based on ITS-1 sequences. Bootstrap values (2,000 replicates, nodes supported with >50%) are given on the branches. (B) Condensed Bayesian tree. Values are for posterior probability values (2,000,000 generations).

that the Italian and French specimens of *C. montanus* were thus correctly identified. However, as shown on the Fig. 2, A and B, specimen identified as obso 1 is placed in the cluster with the other three specimens of *C. montanus* in both trees, whereas the specimens identified as obso 2 and obso 3 are placed in another cluster in both trees. A larger number of specimens of the *C. montanus* and *C. obsoletus* from a wider geographic range would assist in resolving their close genetic relationship observed in this study.

Acknowledgments

Part of this project was funded by Fonds National de la Recherche-Institut National de la Recherche Agronomique-Action Concertée Incitative, Ecologie quantitative-Ministère Français de la Recherche.

References Cited

- Baldet, T., J. C. Delécolle, B. Mathieu, S. De La Roque, and F. Roger. 2004. Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Vet. Ital.* 40: 226–231.
- Baylis, M., and P. S. Mellor. 2001. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. *Vet. Rec.* 149: 659.
- Beckenbach, A. T., and A. Borkent. 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 21–35.
- Calistri, P., M. Goffredo, V. Caporale, and R. Meiswinkel. 2003. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J. Vet. Med.* 50: 132–138.
- Campbell, J. A., and E. C. Pelham-Clinton. 1960. A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. R. Soc. Edinb. B* 67: 181–302.
- Capela, R., B. V. Purse, I. Pena, E. J. Wittman, Y. Margarita, M. Capela, L. Romao, P. S. Mellor, and M. Baylis. 2003. Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Med. Vet. Entomol.* 17: 165–177.
- Caracappa, S., A. Torina, A. Guercio, F. Vitale, A. Calabro, G. Purpari, V. Ferrantelli, M. Vitale, and P. S. Mellor. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet. Rec.* 153: 71–74.
- Carpenter, S., H. L. Lunt, D. Arav, G. J. Venter, and P. S. Mellor. 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J. Med. Entomol.* 43: 73–78.
- Cêtre-Sossah, C., T. Baldet, J. C. Delécolle, B. Mathieu, A. Perrin, C. Grillet, and E. Albina. 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Africa and Europe, by ITS1rDNA PCR amplification. *Vet. Res.* 35: 325–337.
- Chaker, E., and M. Kremer. 1983. Méthode d'étude des larves de stade IV du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 1: 11–16.
- Delécolle, J. C. 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Ph.D. dissertation, UFR Sciences de la Vie et de la Terre, Université Louis Pasteur de Strasbourg I, France.
- Glouhova, V. M., N. K. Nedelchev, I. Rousev, and T. Tanchev. 1991. On the fauna of blood sucking midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Bulgaria. *Vet. Sci.* 25: 63–66.
- Gomulski, L. M., R. Meiswinkel, J. C. D. Delécolle, M. Goffredo, and G. Gasperi. 2005. Phylogenetic relationship of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst. Entomol.* (DOI:10.1111/j.1365-3113.2005).
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment [ed.], and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hill, M. A. 1947. The life-cycle and habits of *Culicoides impunctatus* and *C. obsoletus*, together with some observations on the life-cycle of *C. odibilis*, *C. pallidicornis*, *C. cubitalis* and *C. chiopterus*. *Ann. Trop. Med. Parasite* 41: 55–115.
- Holmes, I. H., G. Boccardo, M. K. Estes, and M. K. Furuchi. 1995. Family Reoviridae. In: *Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Vienna, Austria 10: 208–239.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Kettle, D. S., and J. W. H. Lawson. 1952. The early stages of british biting midges *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) and allied genera. *Bull. Entomol. Res.* 43: 421–467.
- Kremer, M. 1965. Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. In *Encyclop. Entomol. Série A*, vol. 39, P. Lechevallier, Paris, France.
- Kremer, M., and C. Rebholz. 1977. Systematics of the obsoletus complex group of *Culicoides* (subgenus *Avaritia*) in the Palearctic region, with remarks on some types. *Mosq. News* 37: 278.
- Li, G. Q., Y. L. Hu, S. Kanu, and X. Q. Zhu. 2003. PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Vet. Parasitol.* 112: 101–108.
- Meiswinkel, R. 2006. The *Culicoides* vector of bluetongue disease in Limburg, The Netherlands. Bluetongue-Europe (14): new vector. (<http://www.promedmail.org>).
- Mellor, P. S., and J. Pitzolis. 1979. Observations and breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreaks of bluetongue in Cyprus. *Bull. Entomol. Res.* 69: 229–234.
- Mellor, P. S., and E. J. Wittmann. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Vet. J.* 164: 20–37.
- Miranda, M. A., D. Borrás, C. Rincon, and A. Alemany. 2003. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Med. Vet. Entomol.* 17: 52–54.
- Perrier, X., A. Flori, and F. Bonnot. 2003. Data analysis methods, pp. 43–76. In P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, and J. C. Glaszmann [eds.], *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Science Publishers, Montpellier, France.
- Perrin, A., C. Cêtre-Sossah, B. Mathieu, T. Baldet, J. C. Delécolle, and E. Albina. 2006. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS-1rDNA sequences. *Med. Vet. Entomol.* 20: 219–228.
- Purse, B. V., P. S. Mellor, D. J. Rogers, A. R. Samuel, P. P. Mertens, and M. Baylis. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 171–181.
- Rawlings, P. 1997. A key based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille-Diptera-Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia* 52: 57–71.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.

November 2007

MATHIEU ET AL.; MOLECULAR IDENTIFICATION OF OBSOLETUS COMPLEX

1025

- Sarto i Monteys, V., and M. Saiz-Ardanaz. 2003. *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Med. Vet. Entomol.* 17: 288–293.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, P. De Santis, and R. Meiswinkel. 2003. Transmission of bluetongue virus in Italy. *Vet. Rec.* 152: 119.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, A. Di Gennaro, M. A. Cafiero, L. Baldi, P. de Santis, R. Meiswinkel, and V. Caporale. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera; Ceratopogonidae) in Italy. *Vet. Rec.* 157: 133–139.
- Thiry, E., C. Saegerman, H. Guyot, P. Kirten, B. Losson, F. Rollin, M. Bodmer, G. Czaplicki, J. F. Toussaint, K. De Clercq, et al. 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet. Rec.* 59: 327.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Van de Peer, Y., and R. De Watchter. 1993. Treecon: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 177–182.
- Wirth, W. W., and N. Marston. 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61: 783–784.

Received 2 August 2006; accepted 12 January 2007.

Available online at www.sciencedirect.com

Vaccine 25 (2007) 6774–6783

www.elsevier.com/locate/vaccine

Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants

Aurélien Perrin^a, Emmanuel Albina^a, Emmanuel Bréard^b, Corinne Sailleau^b, Sylvie Promé^a,
Colette Grillet^a, Olivier Kwiatek^a, Pierre Russo^c, Richard Thiéry^c,
Stephan Zientara^b, Catherine Cêtre-Sossah^{a,*}

^a CIRAD-Département BioS, UPR15, TA A-15, Campus International de Baillarguet, 34398 Cedex 5 Montpellier, France

^b AFSSA-INRA-ENVA, UMR 1161, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

^c AFSSA-Unité Pathologie des Petits Ruminants, 105 Route des Chappes, BP111, 06902 Sophia Antipolis, France

Received 14 February 2007; received in revised form 10 May 2007; accepted 22 June 2007

Available online 16 July 2007

Abstract

The development of recombinant capripoxviruses for protective immunization of ruminants against bluetongue virus (BTV) infection is described. Sheep ($n=11$) and goats ($n=4$) were immunized with BTV recombinant capripoxviruses (BTV-Cpox) individually expressing four different genes encoding two capsid proteins (VP2 and VP7) and two non-structural proteins (NS1, NS3) of BTV serotype 2 (BTV-2). Seroconversion was observed against NS3, VP7 and VP2 in both species and a lymphoproliferation specific to BTV antigens was also demonstrated in goats. Finally, partial protection of sheep challenged 3 weeks after BTV-Cpox administration with a virulent strain of BTV-2, was observed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bluetongue; Capripoxvirus; Vaccine

1. Introduction

The development of poxviruses as vectors for producing recombinant vaccines is well documented [1–3]. Although vaccinia virus (VV) was the first and most extensively developed poxvirus vector, concerns over its use in immunocompromised persons and its broad host-range specificity had led to the search for alternative poxviruses which might prove more suitable vectors. Attenuated strains of lumpy skin disease virus (LSDV) and sheeppox virus (SPV), both members of the *Capripoxvirus* genus [4], have been used effectively as vaccines for many years. A live attenuated strain of LSDV, Kenya Sheep-1 (KS-1), has been used as a vaccine to control sheeppox [5]. More recently this strain and the South

African vaccine strain of LSDV have been developed as vectors for multivalent recombinant vaccines against livestock diseases such as rinderpest, Peste des Petits Ruminants and Rift Valley fever [6–12]. Diseases caused by capripoxviruses in sheep, goats and cattle are economically important in large areas of Africa and Asia. Both sheeppox and goatpox are endemic in Africa, the near East, South and East Asia while lumpy skin disease is spread over most Africa but absent from Asia [13,14]. Capripoxviruses are therefore potentially ideal poxvirus vectors for the development of recombinant multivalent vaccines to enable delivery of antigens from other ruminant pathogens that share the same geographical distribution. Another important infectious, non-contagious viral disease of ruminants present in the Mediterranean basin and northern Africa is bluetongue (BT) [15,16]. Bluetongue virus (BTV) is thought to infect all known species of ruminants. Severe disease usually occurs only in certain breeds of sheep,

* Corresponding author. Tel.: +33 467593724; fax: +33 467593798.
E-mail address: catherine.cetre-sossah@cirad.fr (C. Cêtre-Sossah).

particularly the fine wool and mutton breeds and some species of deer, most notably the North American white-tailed deer [17]. However, recent outbreaks due to serotype 8 occurred in northern Europe in both sheep and cattle [18]. Clinical signs may include fever, depression, excessive salivation, nasal discharge, facial oedema, hyperaemia, ulceration of the oral mucosa and death. Unimproved indigenous sheep, cattle and goats are usually highly resistant to the clinical effects of infection and therefore the vast majority of BTV episodes throughout the world are completely silent [17,19]. The virus, consisting of 24 different serotypes, is transmitted between its vertebrate hosts by few species of biting midges of the *Culicoides* genus (Diptera: Ceratopogonidae) [20]. BTV is a double-stranded RNA virus within the genus *Orbivirus* of the family *Reoviridae* [21]. The virion consists of a core containing 10 segments of dsRNA [22,23] that encode 7 structural (VP1 to VP7) and 4 non-structural proteins (NS1 to NS3/NS3A). The outer capsid is made up of two major structural proteins, VP2 and VP5 (segments 2 and 5, respectively), involved in cell attachment and virus entry. VP2 is known to contain the major neutralization determinant of BTV and VP5 influences virus neutralization through its conformational interaction with VP2 [24]. Inner capsid is made of two major structural proteins VP3 and VP7 (encoded by segments 3 and 7, respectively) and three distinct minor proteins (VP1, VP4 and VP6 corresponding to segments 1, 4 and 9 respectively) [25]. Four other non-structural proteins, produced during the viral cycle (NS1, NS2 and NS3/NS3A) (segments 6, 8 and 10), are more conserved among serotypes [26].

Previous studies involving coexpression of VP2 and VP5 as virus-like particles (VLPs) or in combination with core proteins [27–29] confirmed the viability of a subunit BTV vaccination strategy. However, these vaccines have not yet been adopted for field use and only the live attenuated vaccines that confer serotype-specific protection have been widely used to prevent bluetongue in livestock, including the recent epidemic in the Mediterranean basin [30]. However, several authors [31–36] have described side-effects resulting from the residual pathogenicity of live attenuated vaccines against BTV. A recent study using recombinant canarypox virus coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 induced high level of protection in sheep but still remains serotype specific [37]. Both the product of virus neutralizing antibodies and the activation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have been shown to have a role in protective immunity. CTLs have been demonstrated to be sufficient to clear the virus from infected hosts. BTV infection has previously been shown to induce BTV-specific CTLs in both sheep and mice [38,39], and their effect was shown to be maximal around 14 days post immunization (PI) [40]. Mice immunized with a single BTV type were shown to produce CTLs which were cross-reactive with a number of BTV [41]. The genes VP2 and NS1 are described to be major CTL immunogens [28] and the genes VP3, VP5 and VP7 shown to be less immuno-dominant [42,43]. A previous study has demonstrated a significant protective immune response with

a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against homologous challenge [44] with a potential role of CTLs in conferring partial heterotypic immunity to BTV infection in sheep [45]. Lobato et al. [27] demonstrated that a BTV-VP5 recombinant vaccinia virus can induce antibodies and partial protection. This protection is improved when both recombinant VP2 and VP5 are associated. In this study, recombinant capripoxviruses (BTV-Cpox), expressing VP2 derived from BTV serotype 2, or the conserved VP7, NS1 and NS3 proteins, were developed in order to induce at least homologous protection. These BTV-Cpox recombinants were administered to goats and sheep and immune responses were evaluated in both species. Sheep were also challenged with a pathogenic BTV serotype 2.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of BTV genes and generation of capripoxviruses

The four distinct full-length BTV genes NS1, NS3, VP7 and VP2 corresponding to segments 6, 10, 7 and 2, respectively were amplified from a Corsican strain of BTV-2 [46] and inserted into pFastBac-HTA (Invitrogen, USA) (for NS1, NS3 and VP7) and in TOPO-XL (Invitrogen, USA) (for VP2). These four genes were individually subcloned into pKSCATpSGPT, a shuttle plasmid designed in the laboratory from a pBluescript II KS backbone for homologous recombination in the capripoxvirus vector [6]. All BTV genes were placed under the control of the early/late synthetic promoter (PS) from vaccinia virus (generous gift from Dr. Drillien, University of Strasbourg, France). The *Escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene (*Eco*gpt), also under control of the PS promoter, but in the opposite orientation, was used as a dominant selectable marker to isolate the recombinants [47,48]. The insertion site in the capripoxvirus genome was the viral thymidine kinase (TK) gene [49–51]. All plasmids were amplified in *E. coli* Top10 competent cells (Stratagene, USA), and purified under endotoxin free conditions using the Endofree plasmid maxi kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions.

Gene expression (Fig. 1) was then checked in transient expression assays in lamb testis cells (OA3Ts) co-infected with parental virus, KS-1. Recombinants were then generated in OA3Ts as described previously [9], but using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) in place of Lipofectine.

To test the expression of BTV proteins by the recombinant capripoxviruses, monolayers of OA3Ts cells were infected and fixed after 48 h with cold acetone for 30 min at -20°C . Polyclonal antibodies against BTV proteins were added for 1 h at 37°C , followed by fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin G (IgG) incubation. Viral supernatants resulting from capripoxvirus-infected cells transfected with the insertion vector were used to select recombinants in the presence of the *Eco*gpt selection

Table 1
Primers used for the PCR detection of BTV-Cpox recombinants

Primers	Sequences	T_m (°C)
CPTK9	5'-TCCTATAAATATATAAATAACAAATAAC-3'	46
CPTK10	5'-CAACACgATTATATTTTCCTTACCC-3'	53
BTV-VP2-F1	5'-ATggATgAACTTCgTATCCTTTTCg-3'	56
BTV-VP7-F1	5'-CgCgCAATCgCACgTgTAAg-3'	64
BTV-NS1-F1	5'-AgATTgATgATTCTCTTTCAGC-3'	51
BTV-NS3-F1	5'-gTTAAAAgTgTCgCTgCCATgCTATC-3'	60

medium containing mycophenolic acid (MPA) [10]. After the development of cytopathic effects (CPE), two sequential rounds of plaque purification followed by end-point dilutions were carried out to purify recombinant viruses from parental viruses. To confirm the nature and the purity of our clones, a PCR-based method was adopted. For this purpose, several sets of primers (Table 1) were designed to detect recombinant and/or parental viruses: BTV-2 gene-specific primers (VP2-BTV2 F1, VP7-BTV2 F1, NS1-BTV F1, and NS3-BTV F1) and capripoxvirus TK gene-specific primers (CPTK9/CPTK10). Viral DNA was extracted from viral suspension using Qiamp DNA MiniKit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. Specific recombinant capripoxvirus PCR reactions were performed in a total volume of 50 μ l consisting of 10 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 μ M of each dNTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer (CPTK9/BTV2-F1), and 2.5 U Taq

DNA polymerase (Qiagen, USA) under the following thermocycling conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min; then 30 cycles [94 °C, 1 min; between 50 and 56 °C depending of the sequences to amplify; 72 °C, between 1 and 4 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. A volume of 5 μ l of viral DNA was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide. Recombinant and parental viruses were amplified by using primers CPTK9/CPTK10. Reactions were performed as previously described with the following thermocycling conditions: an initial denaturation stage at 94 °C for 5 min; then 30 cycles [94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 1 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. Table 2 summarizes the expected sizes of the different PCR products used to define the nature and purity of each BTV-Cpox recombinant construct.

2.2. Capripoxvirus immunization and BTV challenge

BTV challenges were performed in goats with a vaccinal strain of BTV-2, passaged on Vero cells and in sheep with a blood source wild-type serotype 2 strain (generous gift from Merial, France).

2.2.1. Experiment 1

Two groups of four Saanen goats were purchased from a western French region free of BTV infection and housed in an insect proof stabling facility. Animals which were seronegative for both viruses (capripoxvirus and BTV) were individually immunized subcutaneously (day 0) with either a suspension of 2×10^6 TCID₅₀ of negative control recombinant capripox-HPPR vaccine expressing the haemagglutinin

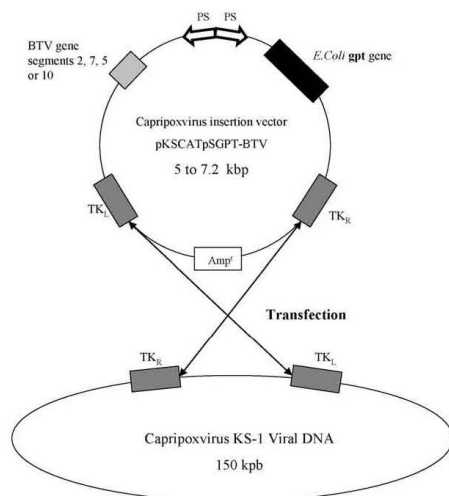


Fig. 1. Insertion of the BTV genes into the TK gene of the attenuated capripoxvirus strain, KS-1. The capripoxvirus DNA insertion vector, pKSCATpSGPT-BTV consists of the KS-1 thymidine kinase gene (TK) disrupted by a multiple cloning site (MCS) where the four full-length BTV genes have been individually inserted (under control of the VV early/late synthetic promoter, PS), the *E. coli* gpt is a dominant selectable marker gene (also under control of the VV promoter, but in the opposite orientation). Arrows indicate the direction of transcription of the VV promoters.

Table 2
Expected PCR product sizes of BTV-Cpox recombinants and KS-1 parental strain

	PCR product length (bp)	
	CPTK9/CPTK10	CPTK9/F1
Recombinants		
BTV-VP2	4361	3194
BTV-VP7	2461	1338
BTV-NS1	3061	1947
BTV-NS3	2161	1353
KS-1 attenuated strain	714	–

of the peste des petits ruminants virus (PPRV) [6] or with 2×10^6 TCID₅₀ of each BTV-Cpox recombinant construct. Three weeks after immunization (day 21), all animals were challenged subcutaneously with 10^4 TCID₅₀ of the BTV-2 attenuated vaccine strain. One goat in the control group died from metabolic disorders before the immunization. EDTA whole blood was collected for RNA extraction at days 21, 23, 25, 28 and heparinised whole blood for PBMC isolation at days 0, 7, 14, 28, 35, 42 post immunization. Serum for antibody detection was collected immediately prior to immunization and at weekly intervals.

2.2.2. Experiment 2

Twenty-one Pré-Alpes sheep purchased from a eastern French region free of BTV infection were divided into 2 groups of 10 and 11 sheep and were housed in a level 3 stabling facility. Animals from each group were individually immunized subcutaneously (day 0) with either a suspension of 2×10^6 TCID₅₀ of recombinant capripox-HPPR vaccine (negative control group) or with 2×10^6 TCID₅₀ of each BTV-Cpox recombinant construct (BTV-Cpox group). Three weeks after inoculation (day 21), all animals were challenged subcutaneously with 10^4 TCID₅₀ of the virulent BTV-2 strain. They were observed daily for the appearance of clinical signs which were used collectively to give a final severity score for each animal: overall behaviour (good, 0pt; apathy, 1pt; prostration, 2pts; recumbence, 3pts), clinical signs (oedema [facial, 1pt, nasal, 1pt, mandibular, 1pt, lips, 1pt, tongue, 1pt]; skin or hoof congestion, 4pts; locomotion difficulties [stiffness, 2pts, limp, 2pts]; respiratory problems [mild discharge, 1pt, severe nasal discharge, 2pts, cough, 1pt]; digestive problems, 1pt; others [conjunctivitis, 1pt, oral ulcers, 1pt, plaintive bleating, 1pt, hypersalivation, 1pt]), death, 20 pts. The score given for one animal in Fig. 4 corresponds to the total number of points accumulated during the experiment (from the day of the challenge [day 42] till the day of euthanasia [day 76]) divided by the number of days this animal presented clinical signs. EDTA whole blood was collected for RNA extraction at days 21, 25, 28 days post immunization and sera were collected at weekly intervals.

2.3. Antibody assays

Serum antibodies to BTV-VP7/NS1/NS3, BTV/VP2, haemagglutinin H of PPRV and capripoxvirus were detected by indirect ELISA, virus neutralization test (VNT), competitive ELISA and IFA, respectively.

2.3.1. BTV-(VP7/NS1/NS3) antibody detection by indirect ELISA

Polysorp plates (Nunc, USA) were coated with either VP7 or NS1 or NS3 baculovirus expressed proteins diluted 1/50 in PBS (50 µl per well) and incubated overnight at 4 °C. Plates were then saturated with blocking buffer (PBS-Tween 20 0.05%, BSA 1% and skimmed milk 3%). The animal sera, diluted 1/100 in blocking buffer, were added and incubated for 45 min at 37 °C. After four washes in PBS-Tween 20–0.05%, plates were incubated for 45 min at 37 °C with an anti-goat-HRP secondary antibody (P0163, Dako, USA) at a 1/6000 dilution in blocking buffer. Finally, after four washes, the reaction was developed with 100 µl of substrate solution (1 mg of *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) per millilitre, 0.03% H₂O₂) and stopped by the addition of 100 µl of sulphuric acid (1 M). Results were expressed as optical densities (ODs) measured at 492 nm. Values obtained from the different sera samples during the course of the experiment were compared to day 0. Values were considered significant when ODs were higher than the mean value plus two-standard deviations of ODs at day 0.

bated for 45 min at 37 °C. After four washes in PBS-Tween 20–0.05%, plates were incubated for 45 min at 37 °C with an anti-goat-HRP secondary antibody (P0163, Dako, USA) at a 1/6000 dilution in blocking buffer. Finally, after four washes, the reaction was developed with 100 µl of substrate solution (1 mg of *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) per millilitre, 0.03% H₂O₂) and stopped by the addition of 100 µl of sulphuric acid (1 M). Results were expressed as optical densities (ODs) measured at 492 nm. Values obtained from the different sera samples during the course of the experiment were compared to day 0. Values were considered significant when ODs were higher than the mean value plus two-standard deviations of ODs at day 0.

2.3.2. BTV-VP2 antibody detection by VNT

Duplicates of three-fold serial dilutions of sera starting from 1:5 were added to 100 TCID₅₀ of BTV serotype 2 into 96-well microtitre plates and incubated for 1 h at 37 °C. Then 100,000 Vero cells were added to each well and the plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 5–6 days. Titers were expressed as the inverse highest dilutions giving 50% of CPE. Sera with titers higher than 10 were considered to be positive.

2.3.3. H-PPR antibody detection using ELISA

Antibody responses to H-PPR were measured using a competitive ELISA as described by Libeau et al. [52].

2.3.4. Capripoxvirus antibody detection using IFA

OA3Ts cells seeded in microtitre plates were infected with the KS-1 strain at a multiplicity of infection (moi) of 0.25 pfu per cell. 48 h later at 37 °C, 5% CO₂, the cells were fixed with 80% acetone for 30 min at –20 °C. All test sera, diluted 1/50, were added in duplicate and incubated for 30 min at 37 °C. Fluorescein-conjugated anti-goat, or anti-sheep, serum (F0250 and F0135, respectively—Dako, USA) was added at a dilution of 1/50 and incubated for a further 30 min at 37 °C. Readings were performed using an inverted epifluorescence microscope (Nikon, eclipse TE300). Positive and negative controls were included in the test.

2.4. Antigen specific lymphoproliferation assay in goats

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood. Isolation of sheep PBMCs was performed but lymphoproliferation assays could not be achieved due to technical problems. Only data on goats are presented in this paper. Blood diluted 1:3 in PBS was centrifuged at RT at 3000 rpm for 30 min over Histopaque 1083 (Sigma, USA). Cells collected at the interface were washed three times in PBS and labelled with cell trace carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, USA). They were then resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin B (250 µg/ml) and L-glutamin

(2 M) (Sigma, USA) and seeded in round-bottom microtitre plates. Different UV-inactivated viral suspensions (KS-1 and BTV-2) were appropriately diluted and added to the wells as antigen preparations. Negative and positive controls for lymphoproliferation consisted of RPMI and Concanavalin A (ConA, 5 µg/ml, Sigma, USA), respectively. PBMCs were collected after 4 days of incubation at 37 °C and analyzed for blastogenesis and proliferation by flow cytometry using a FACsort and cellQuest 3.01 software package (Becton Dickinson, USA). Forward (FSC) and side (SSC) scatter dot plots were used to exclude dead cells (lower left events) and to estimate lymphoblastic cells (upper-rightward displacement of events). Lymphoproliferative cells were estimated as events with reduced green fluorescence on an FL1xFSC dot plot.

2.5. Detection of BTV in blood

EDTA-whole blood from goats was collected on the day of the challenge (day 21) and at days 2, 4 and 7 post-challenge corresponding to days 23, 25 and 28 PI, whereas EDTA-whole blood from sheep was collected at days 21, 25 and 28 PI. All blood samples were stored at –80 °C until required. BTV detection using RT-PCR was performed directly on blood. However, none of the goats challenged with an attenuated and cell culture-adapted BTV-2 strain presented viraemia detectable by RT-PCR. Then, blood samples of goats were inoculated onto Vero cells and incubated for 6 days as previously described [53] and RT-PCR detection was subsequently performed on clarified supernatants of frozen/thawed cells. RNA from blood was extracted by Trizol method as described in Toussaint et al. [54], whereas RNA from cell supernatant was extracted using the RNeasy tissue kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using the "first-strand cDNA synthesis" Kit (Amersham Biosciences, UK) according to manufacturer's instructions. NS1 gene was amplified by RT-PCR using primers 11–31 and 284–265 [55]. Reactions were performed in a total volume of 50 µl consisting in 10× PCR reaction buffer, 250 µM of each dNTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer,

and 2.5 U Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) under the following thermocycling conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles [94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min, 72 °C, 1 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. A volume of 10 µl of cDNA was added to each RT-PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination.

2.6. Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used to compare ODs obtained from the NS3 and VP7 ELISAs between the control and BTV-Cpox groups. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Clinical scores obtained for sheep were compared using the Kruskal–Wallis test. Significance of the lymphocyte proliferation data was performed using the student t test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Generation of recombinant capripoxviruses

In order to evaluate the expression of the BT recombinant proteins from their respective insertion vectors in transfected cells, transient expression studies using IFA were performed. Fluorescence was visualized on lamb testis (OA3Ts) cells infected with the VP7-Cpox recombinant but not on cells infected with the wild-type KS-1 strain. Recombinants were then generated and selected in the presence of the *E. coli* gpt selection medium containing mycophenolic acid as described previously [10].

The purity of the BTV-Cpox recombinant viruses was confirmed by the absence of detectable parental virus (KS-1) using a PCR performed directly on DNA extracted from the viral supernatant and targeting the TK gene. Fig. 2 presents PCR products obtained from samples collected at different steps in the procedure of selection. As shown on Fig. 2a, two specific bands corresponding respectively to parental KS-1 DNA (714 bp) and the recombinant Cpox VP7 DNA (2461 bp) were obtained from a clone from the first round of

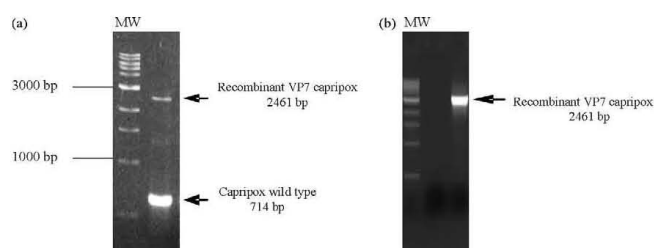


Fig. 2. PCR amplification of recombinant virus. Agarose gel electrophoresis showing PCR products (using the CPTK9/CPTK10 primer pair) of BTV-VP7 recombinant capripoxvirus and KS-1 before selection (a) and after selection (b). MW corresponds to a 1 kb DNA ladder (Biolabs, UK).

Table 3
Detection of BTV antibodies

ELISA/VNT	Days post-immunization				
	0	14	21	28	35
NS3					
Control group	0.152 ± 0.013 0/10	0.118 ± 0.011 0/10	0.126 ± 0.024 1/10	0.128 ± 0.022 1/10	0.364 ± 0.065 7/7
BTV-Cpox group	0.133 ± 0.025 0/11	0.188 ± 0.054* 6/11	0.206 ± 0.068* 8/11	0.208 ± 0.06* 8/11	0.564 ± 0.015* 10/10
VP7					
Control group	0.045 ± 0.005 0/10	ND	0.087 ± 0.016 0/10	0.154 ± 0.083 5/10	0.215 ± 0.067 7/7
BTV-Cpox group	0.06 ± 0.019 0/10	ND	0.126 ± 0.056* 4/11	0.156 ± 0.062 8/11	0.471 ± 0.061* 10/10
VP2					
Control group	0 0/10	ND	0 0/10	4 3/10	472 6/7
BTV-Cpox group	0 0/11	ND	9.55* 3/11	11.82* 6/11	760* 9/10

Animal sera were tested at different time points before and after BTV challenge (day 21). Results (mean ± 2 OD) are expressed in OD values for NS3 and VP7; results (mean) are expressed in titers for VP2. 6/11 means seroconversion of 6 animals out of 11. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant. ND: not determined.

selection. A single band at 2461 bp was obtained for the same clone after further rounds (Fig. 2b).

3.2. Immunogenicity of BTV-Cpox vaccine in goats and sheep

In both animal experiments, kinetic analysis of BTV and Cpox antibodies was performed in serum samples collected weekly over a 7-week period PI. Antibodies to capripoxvirus, as revealed by IFA, were detected as early as 2 weeks PI in some animals and at 1 week PI in all animals (whether immunized with control HPPR-Cpox or BTV-Cpox viruses).

Three different ELISAs were used to analyze anti-NS3, anti-VP7 or anti-NS1 antibodies whereas VNT was used for anti-VP2 antibody detection. Since both goats and sheep gave similar results, only the sheep results are presented in this paper. A NS3 seroconversion was observed as early as 1 week PI for 6 animals out of 11, and for 8 animals out of 11 at day 21 (3 weeks PI) in the BTV-Cpox group compared to the control animals which only seroconverted at day 35; that is 2 weeks after the virulent challenge (Table 3). VP7 seroconversion was observed in four animals inoculated with the BTV-Cpox recombinant at 3 weeks PI (day 21) and for the remainder of the group at 2 weeks post BTV challenge (day 35). The boost in the VP7 antibody response at day 35 (Table 3) correlated with the anti-NS3 boost observed in the BTV-Cpox group animals. OD values of the BTV-Cpox group were significantly different from those of the control group.

Due to limitations of the technique used, anti-NS1 antibody detection could not be interpreted. Anti-VP2 antibodies were detected by virus neutralization testing (VNT) the day of the challenge (day 21) in 3 animals out of 11 in the BTV-Cpox

group. Three more animals seroconverted one week later and by day 35, 9 out of the 10 had seroconverted (1 sheep died between days 28 and 35). Titers of the BTV-Cpox group were significantly different from the values of the control group at days 21, 28 and 35 ($p < 0.05$). As expected, animals immunized with HPPR-Cpox seroconverted to HPPR, whereas those immunized with BTV-Cpox did not seroconvert (data not shown).

3.3. Cell-mediated immunity in goats

Antigen-specific blastogenesis and lymphocyte proliferation were monitored at weekly intervals after the attenuated BTV challenge.

A BTV-specific proliferation was first observed at day 14 for the four animals of the BTV-Cpox group. A significant effect was observed for the four animals included in the BTV-Cpox group at day 28 (1 week PI) compared to the control group (Fig. 3a). No significant BTV-specific lympho-proliferation was obtained, as expected, in the control group at any time point (Fig. 3a). A Cpox-specific lympho-proliferation was observed at day 28 (4 animals out of 4), and from day 28 (4/4) to day 42 (3/4) for the BTV-Cpox group (Fig. 3b). Surprisingly, a specific Cpox proliferation was obtained only at day 42 (3 animals out of 3) for the animals in the control group (Fig. 3b). This low level and delayed response of Cpox-specific proliferation in control group animals may be due to the fact they were immunized with a dose 4 times lower than the BTV-Cpox group animals (2.10^6 TCID₅₀ versus $2 \times 4 \times 10^6$ TCID₅₀). Specific blastogenesis (BTV and Cpox) and lympho-proliferation (BTV and Cpox) gave similar results (data not shown).

6780

A. Perrin et al. / Vaccine 25 (2007) 6774–6783

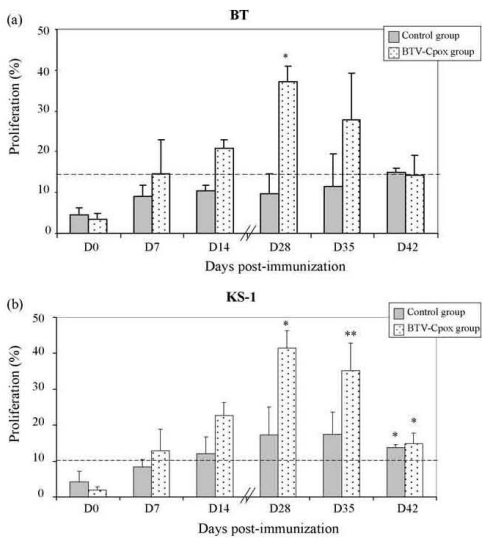


Fig. 3. Lymphocyte proliferation assay of BTV-Cpox vaccinated goats. PBMCs isolated from either the control group or the BTV-Cpox group were stimulated with whole inactivated BTV antigen (a) and whole inactivated KS-1 antigen (b) for 4 days. The resulting proliferation was determined by CFSE incorporation. The dotted-line corresponds to the mean of proliferation observed for cells alone. Significance was performed using the Student *t*-test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant.

3.4. Protection studies

The ability of BTV-Cpox vaccines to protect sheep and goats against disease and virus replication was evaluated by scoring clinical signs after virulent BTV-2 challenge and by detection of BTV, respectively (Table 4). One animal out of 11 died at day 55 in the BTV-Cpox group whereas 3 animals out of 10 died at days 53, 54 and 58 in the negative control group (inoculated with H-PPR Cpox vaccine and challenged with virulent BTV). Results presented in Fig. 4 are total scores which include mortality (20 points) obtained for each animal. A significant difference was observed between the two groups using the Kruskal–Wallis test with a p -value < 0.001 . Two out of 11 animals in the BTV-Cpox group did not present any clinical signs whereas 4 of them presented mild clinical signs after the BTV challenge with a value below 3. All animals from the control group, except one, presented total scores higher than three.

Detection of BTV genome was performed at days 21, 23, 25, 28 PI to evaluate the presence of the virus in the blood of BTV-Cpox inoculated and challenged animals. BTV genome was not detected directly in goats' bloods. However, it could be detected after virus enrichment on VERO cells. Animals which received the H-PPR Cpox vaccine (negative control group) had detectable levels of virus genome in their blood at 2, 4, and 7 days post-challenge whereas no RT-PCR specific

Table 4

Detection of BTV in blood samples

Goats		Days post-immunization			
		21	23	25	28
(a)					
Control group	#3015	—	+	+	+
	#6105	—	+	+	+
	#7031	—	+	+	+
BTV-Cpox group	#8020	—	—	—	—
	#9008	—	—	—	—
	#9022	—	—	—	—
	#9034	—	—	—	—
Sheep		Days post-immunization			
		21	25	28	
(b)					
Control group	#14	—	—	+	
	#16	—	+	+	
	#22	—	+	+	
	#23	—	+	+	
	#32	—	+	+	
	#33	—	+	+	
	#46	—	+	+	
	#58	—	+	+	
	#87	—	+	+	
BTV-Cpox group	#90	—	+	+	
	#2	—	—	—	
	#12	—	—	+	
	#18	—	+	+	
	#31	—	+	+	
	#34	—	—	+	
	#48	—	+	+	
	#50	—	+	+	
	#73	—	—	+	
BTV-Cpox group	#92	—	+	—	
	#95	—	—	+	
	#96	—	+	—	

(a) Represents CPE observed at different time points for experiment 1 whereas (b) represents RT-PCR results expressed as positive and negative for BTV detection for experiment 2.

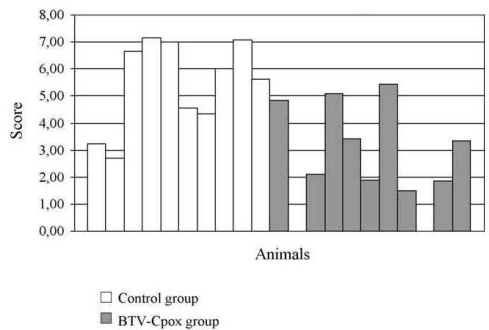


Fig. 4. Scores of clinical signs. Clinical signs including mortality were scored for each animal of the experiment 2. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant.

amplification was detectable in the BTV-Cpox group animals (Table 4a). For sheep, all the animals in the control group except 1, and 5 out of 11 in the BTV-Cpox group, had virus genome in their blood at day 4 post-challenge. However, by day 7 post-challenge 8 sheep out of 11 in the BTV-Cpox group and all the sheep in the control group were positive for BTV genome (Table 4b).

4. Discussion

Live-attenuated (LA) BT vaccines have been used to vaccinate sheep to protect against epizootics of BT disease. These vaccines which have proved to be very effective, are however serotype-specific and therefore require regular injections with appropriate strains to protect against different BTV serotypes. LA BT vaccines may also cause adverse effects owing to incomplete attenuation. Development of alternative vectored vaccines expressing conserved protective antigens and increasing their presentation to the immune system in contrast to natural infection would reduce the number of multi-serotype vaccinations required and still provide a cost-effective product. The aim of this study was to generate and evaluate BT-recombinant capripoxviruses as vaccines. cDNA of complete coding sequences of various BTV serotype 2 genes (NS1, NS3, VP2 and VP7) were introduced into the thymidine kinase gene of the Kenya Sheep (KS-1) vaccine strain of capripoxvirus. The transgenes were selected according to the results of previous studies with the objective of including the most immunogenic and/or conserved BTV proteins. A previous study demonstrated a significant protective immune response with a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against a homologous challenge [44]. The VP2 and NS1 proteins are described to be major CTL immunogens [29] while VP3, VP5, VP7 proteins were shown to be less immuno-dominant [42,43]. Moreover, BTV-NS2 protein has been shown to generate CTL in mice [56]. However, due to persistent difficulties in cloning the NS2 protein, we were not able to include this antigen in our approach. Finally, NS3 was selected because it is highly conserved between different serotypes. The synthesis of BTV proteins for each recombinant expression vector was confirmed by IFA using the appropriate anti-sera. Four individually cloned BTV recombinants expressing the four distinct proteins of BTV (NS1, NS3, VP2 and VP7) were produced. Antibody and cell-mediated immune responses to those recombinants were evaluated in two animal experiments. The first experiment with goats was designed to evaluate the immunogenicity of these recombinants and also to what extent the conferred immunity could interfere with the replication of a LA BTV-2 virus. The second experiment in sheep was used to assess the protective immunity conferred by the recombinants against a virulent BTV-2 challenge.

In both goats and sheep, seroconversion to NS3, VP2 and VP7 was observed prior to BTV challenge. However,

a boosting effect of BTV challenge was seen in all animals pre-immunized with the BT-recombinant capripoxviruses. In addition, all animals mounted a specific antibody response to capripoxvirus. These results demonstrate the capacity of the capripoxvirus to elicit an immune response in sheep and goats both against the virus and the expressed transgenes. The partial seroconversion observed 3 weeks after immunization is not critical *per se* since in another model, goats with limited antibody formation after vaccination with a recombinant capripoxvirus expressing the PPRV haemagglutinin or fusion proteins, were still fully protected against a virulent PPRV challenge [6,7]. Antibody responses against BTV-NS1 could not be demonstrated with our in-house technique. However, since NS1 expression *in vitro* by the recombinant capripoxvirus was evidenced by mRNA production, the possibility of an anti-NS1 immune response in those animals cannot be ruled out. Antigen-specific blastogenesis and proliferation of goat lymphocytes after *in vitro* restimulation with whole inactivated BTV confirmed the immunogenicity of the recombinant BTV-capripoxviruses delivered to the animals. Unexpectedly, the level of the lymphocyte response to capripoxvirus antigens was significantly different between goats immunized with BTV-Cpox and HPPR-Cpox. This difference is assumed to result from a dose effect between control animals which received a dose of 2×10^6 TCID₅₀/ml and BTV-Cpox animals which received a total dose of 8×10^6 TCID₅₀/ml.

The protective effect of the vectored vaccines against BT was assessed in sheep. Only a partial protection could be observed since several animals developed clinical signs and one animal died. Scored clinical signs between the BTV-Cpox group and the control group were however significantly different ($p < 0.05$). Nevertheless, our results do not correspond with those of Wade-Evans et al. [44] who demonstrated a significant protective immune response with a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against homologous challenge showing that a VP7 recombinant capripoxvirus using the same KS-1 vaccine strain as vector did induce good protection against homotypic virulent challenge and partial protection against a heterotypic challenge. The reasons for this disparity are not yet understood.

The relatively low protection induced in this study, even when four different BTV antigens were co-delivered, might be due to various reasons, including insufficient levels of protein expression, immune stimulation or inadequate immune responses. Alternatively, immunoprotective responses might be not achievable when individual proteins are co-delivered but are not self-associating to form an antigenic hetero-oligomer such as a virus-like particle. A recombinant canarypoxvirus vaccine coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of BTV was recently shown to induce high levels of protection in sheep against a homologous challenge, presumably because these two proteins self-associate to make a virus-like outer capsid [37]. However, the use of VP2 and VP5 may not induce protection against a heterotypic virulent challenge.

Marker vaccines for BT in Mediterranean and North African countries are an important issue since a high percentage of the sheep population is seropositive for BTV, although not showing disease. There is thus a need for a vaccine allowing for discrimination of infected and vaccinated animals (DIVA) through the development of a companion test based on ELISAs using antigens specific to the vaccine or to the wild-type virus. BTV-Cpox constructs with improved efficacy would be ideal candidates to provide DIVA vaccines and tests since they would only express some of the BTV genes and thus vaccinated animals would lack antibodies to other viral proteins, which are present in animals recovering from natural infection. The potential use of Cpox-vectored recombinant constructs as dual vaccines in hosts other than cattle (for LSDV) is supported by the high level of Cpox-neutralizing antibodies obtained in goats and sheep. As the three members of the capripoxvirus genus (SPV, goatpox, LSDV) are closely related it is possible to use heterospecific viruses for inducing protection in all ruminants [57] and there is evidence that LSDV replicates in both sheep and goats.

Acknowledgments

The authors would like to thank Noël Richard, Jean-Michel Guibert, Pascal Morel and Valérie Balcer-Rodrigues for technical assistance and Merial for providing the BTV-2 wild type virus. This research was supported in part by the Région Languedoc Roussillon, France and the French Ministry of Foreign Affairs (MAE) through the FSP project LABOVET 2003-24.

References

- [1] Fries LF, Tartaglia J, Taylo J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, et al. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 1996;14(5):428–34.
- [2] Karaca K, Sharma JM, Winslow BJ, Junker DE, Reddy S, Cochran M, et al. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine* 1998;16(16):1496–503.
- [3] Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983;302(5908):490–5.
- [4] Le Goff C, Fakhfakh E, Chadeyras A, Adulugba EE, Libeau G, Hammami S, et al. Host range phylogenetic grouping of capripoxviruses. In: Makkar HPS, Viljoen GJ, editors. *Applications of Gene-Based Technologies for improving animal production and health in developing countries*. IEAA; 2005. p. 727–33.
- [5] Kitching RP, Hammond JM, Taylor WP. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res Vet Sci* 1987;42(1):53–60.
- [6] Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, et al. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against Peste-des-Petits-Ruminants Virus and Capripoxvirus infections. *J Virol* 2003;77(2):1571–7.
- [7] Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann N Y Acad Sci* 2002;969:88–91.
- [8] Ngichabe CK, Wamwayi HM, Barrett T, Ndungu EK, Black DN, Bostock CJ. Trial of a capripoxvirus-rinderpest recombinant vaccine in African cattle. *Epidemiol Infect* 1997;118(1):63–70.
- [9] Ngichabe CK, Wamwayi HM, Ndungu EK, Mirangi PK, Bostock CJ, Black DN, et al. Long term immunity in African cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest virus vaccine. *Epidemiol Infect* 2002;128(2):443–9.
- [10] Romero CH, Barrett T, Evans SA, Kitching RP, Gershon PD, Bostock C, et al. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine* 1993;11:737–42.
- [11] Romero CH, Barrett T, Kitching RP, Cam VM, Black DN. Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. *Vet Rec* 1994;135:152–4.
- [12] Wallace DB, Ellis CE, Espach A, Smith SJ, Greyling RR, Viljoen GJ. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine* 2006;24(49–50):7181–9.
- [13] Davies FG. Sheep and goatpox. In: Gibbs EPJ, editor. *Virus disease of food animals*, vol. 2. London: Academic press; 1981. p. 7333–48.
- [14] Davies FG. Lumpy skin disease, an African capripox disease in cattle. *Br Vet J* 1991;147:489–502.
- [15] Baylis M, Mellor PS. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. *Vet Rec* 2001;649:659.
- [16] Mellor PS, Wittmann EJ. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Vet Rec* 2002;164:20–37.
- [17] MacLachlan NJ. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994;17(3–4):197–206.
- [18] Thiry E, Saegerman C, Guyot H, Kirten P, Losson B, Rollin F, et al. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* 2006;159(10):327.
- [19] Mellor PS, Bluetongue. *State Vet J* 1994;4:7–10.
- [20] Mellor PS, Boorman J, Baylis M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 2000;45:307–40.
- [21] Mellor PS, Boorman J. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Ann Trop Med Parasitol* 1995;89(1):1–15.
- [22] Gould AR, Hyatt AD. The *Orbivirus* genus, diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994;17:163–88.
- [23] Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res* 1989;13(3):179–206.
- [24] DeMaula CD, Bonneau KR, MacLachlan NJ. Changes in the outer capsid proteins of BTV serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Res* 2000;67:59–66.
- [25] Verwoerd DW. Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology* 1969;38(2):203–12.
- [26] Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, Huismans H. Structure of the Bluetongue Virus capsid. *J Virol* 1972;10(4):793–4.
- [27] Lobato ZIP, Coupar BEH, Gray CP, Lunt R, Adrew EM. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:293–309.
- [28] Roy P, French T, Erasmus BJ. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine* 1992;10:28–32.
- [29] Roy P, Bishop DH, Leblois H, Erasmus BJ. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994;12:805–11.
- [30] Dunga B, Gerdes T, Smit T. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Vet Ital* 2004;40:616–22.
- [31] Hunter P, Modumo J. A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 2001;68(4):331–3.

- [32] Murray PK, Eaton BT. Vaccines for bluetongue. *Aust Vet J* 1996;73(6):207–10.
- [33] Ferrari G, De Liberato C, Scavia G, Loenzetti R, Zini M, Farina M. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype 2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Vet Med* 2005;68:103–13.
- [34] MacLachlan NJ, Osburn BI, Stott JL, Ghalib HW. *Orbivirus* infection of the bovine fetus. *Prog Clin Bio Res* 1985;178:79–84.
- [35] Schultz G, Delay PD. Losses in newborn lambs associated with bluetongue vaccination of pregnancy ewes. *J Am Vet Med Assoc* 1955;127(942):224–6.
- [36] Young S, Cordy DR. An ovine fetal encephalopathy caused by Bluetongue vaccine virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1964;23:635–59.
- [37] Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, Audonnet JC, Yao J, He L, et al. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 2007;25(4):672–8 [Epub 2006 Sep 5].
- [38] Jeggo MH, Wardley RC. The induction of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus. *Arch Virol* 1982;71(3):197–206.
- [39] Takamatsu H, Jeggo MH. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* 1989;66:258–63.
- [40] Jeggo MH, Wardley RC, Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res* 1985;178:477–87.
- [41] Jeggo MH, Wardley RC. Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology* 1982;45(4):629–35.
- [42] Janardhana V, Andrew ME, Lobato ZI, Coupar BE. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res vet Sci* 1999;67(3):213–21.
- [43] Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, Coupar B. Antigen specific of the ovine cytotoxic T lymphocytes response to bluetongue virus. *Vet immunol immunopathol* 1995;47(3–4):311–22.
- [44] Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor PS, Takamatsu H, Anderson J, Thevasagayam J, et al. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 1996;220(1):227–31.
- [45] Stott JL, Osburn BI. Immune response to bluetongue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;162:163–78.
- [46] Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond EM, Lebreton F, et al. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* 2002;150:598–601.
- [47] Boyle DB, Coupar AEH. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene* 1988;65:123–8.
- [48] Falkner FG, Moss B. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* 1988;62:1849–54.
- [49] Dubbs DR, Kits S. Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in TK inducing activity. *Virology* 1964;22:214–25.
- [50] Boyle DB, Coupar AEH, Both GW. Multiple-cloning-site plasmids for the rapid construction of recombinant poxviruses. *Gene* 1985;35(1–2):169–77.
- [51] Wallace DB, Viljoen GJ. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of LSDV generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine* 2005;23:3061–7.
- [52] Libeau G, Prehaud C, Lancelot R, Colas F, Guerre L, Bishop DH, et al. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci* 1995;58(1):50–5.
- [53] Clavijo A, Heckert RA, Dulac G, Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus. *J Virol Methods* 2000;87:13–23.
- [54] Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 2007;140(1–2):115–23.
- [55] Katz JB, Alstad AD, Gustafson GA, Moser KM. Sensitive identification of bluetongue virus serogroup by a colorimetric dual oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acid. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):3028–30.
- [56] Jones LD, Williams T, Bishop D, Roy P. Baculovirus-expressed non-structural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;59(34):293–309.
- [57] Kitching RP, Taylor WP. Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop Anim Health Prod* 1985;17(2):64–74.

Early responses associated with chronic pathology in murine schistosomiasis

C. B. CÉTRE-SOSSAH,¹ M. A. MONTESANO,² G. L. FREEMAN, Jr.,³ M. T. WILLARD,⁴ D. G. COLLEY⁵ & W. E. SECOR

Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, USA

SUMMARY

Inbred male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni* develop either hypersplenomegaly syndrome (HSS) or moderate splenomegaly syndrome (MSS) by 20 weeks of infection. Pathologically and immunologically, MSS and HSS closely parallel the intestinal and hepatosplenic clinical forms of schistosomiasis in humans, respectively. By 6 weeks after infection, mice that eventually will become MSS develop T cell-stimulatory, cross-reactive idiotypes (CRI) while HSS mice never produce CRI. Because presence of CRI is useful to predict degree of chronic pathology, we used this measure to investigate what other early immunological events occurred in animals destined to develop severe morbidity. At 8 weeks of infection, there was a strong inverse correlation between CRI and splenomegaly, egg counts, and liver hydroxyproline. Similarly, phorbol myristate acetate (PMA)- and ionomycin-stimulated intracellular cytokine expression of IL-4, IL-5, and GM-CSF in splenic CD4⁺ T cells was inversely correlated with serum CRI and directly correlated with spleen size. In contrast, spleen cell intracellular TNF- α and peritoneal cell production of nitric oxide demonstrated positive correlations with CRI

and inverse correlations with measures of morbidity. Surprisingly, IL-10 and IFN- γ were not correlated with CRI levels. These studies link chronic pathology to certain immunological responses during the acute phase of schistosomiasis.

Keywords cytokines, idiotypes, mice, schistosomiasis, splenomegaly

INTRODUCTION

Most persons with chronic *Schistosoma mansoni* infections may suffer a variety of subtle morbidities, but do not develop severe hepatosplenic disease (1). Patients with this 'intestinal' form of schistosomiasis experience fatigue and only occasional gastrointestinal discomfort and anaemia despite the continued presence of adult schistosome worms in the mesenteric vasculature. In contrast, a relatively small proportion of infected individuals progress to develop the severe hepatosplenic form of the disease, which is characterized by hepatosplenomegaly, periportal fibrosis, portal hypertension, ascites, esophageal varices, collateral circulation, haematemesis, and, if untreated, death (2). The factors that determine whether an individual develops the intestinal or hepatosplenic form of chronic schistosomiasis are poorly understood, but many studies have implicated a role for immunoregulatory mechanisms in this process (3–6). Investigation of this hypothesis has been limited by the absence of an animal model that predictably develops such a spectrum of disease.

Over the last several years, we have studied inbred male CBA/J mice with chronic *S. mansoni* infections that develop one of two distinct pathophysiological syndromes by 20 weeks of infection: hypersplenomegaly syndrome (HSS) or moderate splenomegaly syndrome (MSS) (7,8). MSS and HSS remarkably parallel the intestinal and hepatosplenic clinical forms, respectively, observed in human schistosomiasis. HSS affects approximately 20% of these mice and presents with massive splenomegaly, ascites, thymic atrophy, severe anaemia, and cachexia. The remaining majority of mice develop only moderate splenomegaly. Histopathological features of HSS include

Correspondence: W. Evan Secor, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Highway, NE, MS-F13, Atlanta, GA 30341-3724, USA (e-mail: was4@cdc.gov).

¹Current Address: Virology Unit, CIRAD-EMVT, Campus International de Baillarguet, TA 30/G, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

²Current Address: Division of Laboratory Science, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Highway, NE, Atlanta, GA 30341, USA.

³Deceased.

⁴Current Address: Winship Cancer Institute, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA.

⁵Current Address: Center for Tropical and Emerging Global Diseases, 145 Coverdell Center, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA.

Received: 30 November 2006

Accepted for publication: 1 December 2006

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

241

extensive hepatic fibrosis, splenic congestion, lymph node plasmacytosis and worms and eggs in the pulmonary vasculature, consistent with the development of portal hypertension and collateral circulation. Most animals that die prior to 20 weeks of infection demonstrate these same characteristics (9).

Immunologically, soluble egg antigen-specific antibodies present in the sera of MSS mice display distinct idiotypes compared to those from sera of chronically infected mice with HSS (10). The idiotype (Id) preparations from sera of MSS mice (MSS Id) stimulate T cell proliferation and the production of distinctive cytokine patterns by spleen cells from infected mice, whereas Id prepared from sera of HSS animals (HSS Id) is not stimulatory. Interestingly, these idiotype differences are similar to those observed in patients with intestinal and hepatosplenic forms of the disease, because Id prepared from intestinal patients' sera stimulates T cells and Id prepared from hepatosplenic patients' sera does not (11). The most exciting aspect of these parallels is the observation that humans with intestinal schistosomiasis and mice with MSS share certain idiotypes, as demonstrated by the cross-reactivity of rabbit antisera specific for intestinal patients' Id with MSS Id (10).

When we performed an investigation to determine when these cross-reactive idiotypes (CRI) could first be detected during experimental infections, we were surprised to find that CRI were present as early as 6 weeks after infection in mice that eventually developed MSS (9). In contrast, it was not possible to detect CRI in the sera of mice that eventually developed HSS or that died before 20 weeks of infection at any time during infection. Furthermore, CRI levels at 6 weeks of infection showed a strong inverse correlation with 20 week splenomegaly and liver hydroxyproline, but not hepatic egg count or worm burden (9). This finding, coupled with the observation that neonatal injection of CRI predisposes mice to less severe pathology and altered immune responses if they are subsequently infected with *S. mansoni*, suggests that CRI may be performing an immunoregulatory function during the course of schistosomiasis-associated pathogenesis (12–14). Because the early presence of CRI is strongly predictive of chronic pathology, and in order to better understand the immunological mechanisms that coincide with, and may be involved in, the establishment of MSS vs. HSS morbidities caused by *S. mansoni* infections, we investigated the relationships between CRI levels, cytokine production profiles of CD4⁺ T cells and stimulation of NO production at 8 weeks after infection.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Male CBA/J mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and housed in the Association

for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care-approved animal care facilities of the Centers for Disease Control and Prevention. They were infected by subcutaneous injection of 45 cercariae of a Puerto Rican strain of *S. mansoni* maintained in *Biomphalaria glabrata* snails. Mice were sacrificed by CO₂ inhalation and exsanguinated by cardiac puncture at 8 weeks after infection. This time-point was chosen rather than 6 weeks after infection (when CRI can first be detected) because there were far more granulomas, antigen-specific immune responses, and detectable cytokine levels at the later time-point. Gross pathological characteristics were noted and spleen percentage of body weight was calculated for each animal. Pieces of liver (~0.5 g) were weighed and frozen for subsequent determination of egg and hydroxyproline levels.

Enumeration of eggs and hydroxyproline levels in the liver

For enumeration of eggs in the liver (15), a portion of weighed liver from infected mice that had been removed and frozen until digestion was thawed and incubated with 5 mL of 5% KOH at 37°C until the tissue was completely digested (2–4 h). Duplicate 25 µL aliquots of the digest were placed on a glass slide and eggs were counted under a microscope. Data are expressed as eggs per gram of liver tissue.

The collagen content in the liver was estimated by measuring hydroxyproline levels in liver hydrolysates. The original protocol (16,17) was modified for microplate analysis and used as an estimate of liver fibrosis. Briefly, liver samples were hydrolysed in 5 mL of 6 M HCl for 18 h at 110°C in glass tubes, after which 40 mg Dowex/Norit mixture (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 5 mL distilled water were added to each hydrolysate. The mixture was centrifuged for 15 min at 750 g at 25°C, and the supernatant fluid filtered through filter paper into a clean tube. Two millilitres of the filtrate was neutralized by adding one drop of 1% phenolphthalein and then titrated against 10 M NaOH until colourless. The final volume was adjusted to 4 mL. An aliquot (12.5 µL) of neutralized liver hydrolysate was pipetted into each well of a microtitre plate and mixed with 25 µL isopropanol. Freshly prepared oxidant solution (chloramine-T/citrate buffer, pH 6.0, Sigma Chemical Co.) was added (12.5 µL) into each well with mixing and incubated at 25°C for 4 min. Freshly made Ehrlich's Reagent Solution (150 µL, Sigma Chemical Co.) was added, mixed and incubated at 60°C for an additional 25 min. The plate was cooled and absorbance was read at 570 nm using a V_{max} microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Hydroxyproline levels were calculated against standard curves of 4-hydroxy-L-proline (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and expressed as µg hydroxyproline/g tissue.

Soluble *S. mansoni* egg antigen and Id preparations

Soluble *S. mansoni* egg antigen (SEA) preparations were produced as previously described (18,19). Briefly, eggs were isolated by differential centrifugation from homogenized liver tissue of CF-1 mice (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA, USA) infected with 300 cercariae for 7–8 weeks. Soluble material from purified eggs was obtained by homogenization in Dulbecco's PBS and subsequent ultracentrifugation. To prepare affinity-purified, polyclonal anti-SEA Abs, pooled sera from 20-week-infected MSS mice were passed over a column of SEA coupled to cyanogen-bromide-activated Sepharose 4B (Sigma Chemical Co.). Bound anti-SEA Abs (Id) were eluted using 0.1 M glycine-HCl (pH 2.8) and collected into 0.025 M borax. The eluates were concentrated and dialysed against saline. Protein concentrations for SEA and MSS Id preparations were determined using a bicinchoninic acid protein determination kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Competitive ELISAs for Id and for anti-Id

Rabbit anti-MSS Id was prepared by immunizing a rabbit (Myrtle's Rabbitry, Thompson Station, TN, USA) subcutaneously and intramuscularly with 200 µg MSS Id preparation mixed 1:1 in RIBI adjuvant (RIBI ImmunoChem Research, Hamilton, MT, USA). Three injections were given at 15-day intervals. Fifteen days after the final injection, the rabbit was bled. Immunoglobulin was purified from the rabbit serum using a T-Gel purification Kit (Pierce). Id-specific antiserum was prepared by exhaustively absorbing the immunized rabbit serum with normal mouse IgG (Sigma Chemical Co.) coupled to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (10 mg Ig/g Sepharose). Repeated absorptions (15–20) were required to yield reagent, which did not react with normal mouse IgG by ELISA, whereas reactivity with the original immunizing MSS Id preparation was maintained. The competitive ELISA used for measurement of serum Id levels has been described previously (11). Briefly, MSS Id (0.25 µg/mL in 0.1 M NaHCO₃, pH 9.6) was absorbed to the wells of Immulon II plates (Dynatech Laboratories, Inc. Chantilly, VA, USA). Following a blocking step (5% low fat dried milk with 0.3% Tween-20), plates were incubated with anti-MSS Id rabbit sera that had been preincubated with different dilutions of mouse sera in a microcentrifuge tube for 30 min. If Id is present in the mouse sera, it binds to the rabbit anti-MSS Id Abs and prevents them from binding the MSS Id on the plate. The level of rabbit anti-MSS Id bound to MSS Id on the plate was determined by the addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate (Biosource International, La Jolla, CA, USA), followed by TMB substrate (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Reactions were stopped with 1 M H₂SO₄ and read at 450 nm on the V_{max} kinetic microplate

reader. A standard curve was prepared for each plate by preincubating known concentrations of MSS Id with the rabbit anti-MSS-Id.

Intracellular cytokine staining

Mice infected for 8 weeks were weighed, sacrificed, and exsanguinated. Their spleens were removed and weighed, and single spleen cell suspensions were prepared. Erythrocytes were eliminated from the cell suspensions prior to flow cytometry using red blood cell lysing buffer (Sigma). Cells (10×10^6) were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA; 500 ng/mL) and ionomycin (0.5 µg/mL) in 48-well plates for 4 h in the presence of GolgiStop (1 µL/mL) (PharMingen, San Diego, CA, USA). Cells (1×10^6 /cytokine) were stained for flow cytometry after centrifugation in a 96-well U-bottom plate and 1 µg of a phycoerythrin (PE)-conjugated cell surface-specific antibody (CD4, CD8, or isotype control, PharMingen) was diluted in FACS buffer (0.01 M Dulbecco's PBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) and 2% bovine serum albumin (Gibco BRL), with 0.02% sodium azide (Sigma) and added at 5 µg/mL. After 30 min on ice in the dark, cells were washed twice with 150 µL of FACS buffer and pelleted by centrifugation at 320 g for 5 min at 4°C. Cells were then resuspended in 100 µL of Cytolix/CytoPerm (PharMingen) and incubated for 10–20 min at 4°C in the dark. After two washes with 1x Perm/Wash solution (PharMingen), cells were stained in a 50 µL of Perm/Wash solution containing the FITC-conjugated anti-cytokine antibody or appropriate isotype control and incubated at 4°C for 30 min in the dark. After two additional washes in Perm/Wash solution, cells were resuspended in FACS buffer prior to flow cytometric analysis. Flow cytometric data were acquired and analysed on a FACScan flow cytometer using CELLQUEST software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

Nitric oxide production and measurement

For some animals, resident peritoneal cells were obtained by lavage with RPMI, washed, counted, and cultured in 48-well plates (Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) at 2.5×10^6 cells/well in 1 mL RPMI 1640 supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 2% penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and stimulated with medium alone, anti-CD3, (PharMingen; 1 µg/mL), SEA (4 µg/mL), or MSS Id (40 µg/mL) for 48 h, at which time supernatants were harvested and stored at -70°C until they were assayed.

Nitrite concentration, an indicator of NO production, was measured by the Griess reaction. The Griess reagent was prepared by mixing equal volumes of sulfanilamide (1.0% in 5% H₃PO₄) and N-1-naphthylethylenediamine (0.1% in H₂O). A volume of 50 µL of reagent was mixed with 50 µL of

C. B. Cêtre-Sossah et al.

Parasite Immunology

supernatant in 96-well microtitre plates (Immulon II). Plates were incubated at room temperature for 10 min. Absorbance of the chromophore formed was measured at 540 nm using the V_{\max} microplate reader. Nitrite concentrations were calculated by means of a sodium nitrite standard curve and data were expressed as μM nitrite.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GRAPH PAD INSTAT (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Cross-reactive idiotype levels inversely correlate with spleen per cent body weight, hepatic egg concentration and hepatic hydroxyproline levels

We have previously demonstrated that CRI levels, which are high in 20-week-infected MSS mice but absent in mice with HSS, can be detected at as early as 6 weeks of infection (9). Furthermore, CRI levels at 6 weeks of infection accurately indicate which animals will develop MSS, and show a strong inverse correlation with 20-week spleen per cent body weight, hepatic egg levels, and hepatic hydroxyproline levels. We therefore wished to utilize this predictive tool to elucidate the early parasitological and immunological events in animals that would eventually develop MSS or HSS if they were allowed to live until 20 weeks of infection. Similar to the predictive nature of 6-week CRI levels for infection characteristics at 20 weeks, 8-week serum CRI levels were inversely correlated with spleen per cent body weight ratios (Figure 1a, $r = -0.597$, $P < 0.0001$), liver hydroxyproline levels (Figure 1b, $r = -0.366$, $P = 0.024$), and hepatic egg numbers (Figure 1c, $r = -0.348$, $P = 0.030$) at 8 weeks of infection.

Correlations of splenic CD4⁺ T cell intracellular IL-4, IL-5, GM-CSF and TNF- α with serum CRI

To investigate possible immune events associated with CRI production, we looked at the intracellular expression of different cytokines that are produced by CD4⁺ T cells (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , and TNF- α) that have been implicated in the pathogenesis of schistosomiasis, or regulation thereof. Spleen cells from 8-week-infected mice were stimulated for 4 h with PMA and ionomycin and stained with fluorochrome-conjugated anti-cytokine and anti-cell surface antibodies. Representative flow cytometry plots for the various cytokines are shown in Figure 2. Regression analysis revealed statistically significant inverse correlations between levels of serum CRI and percentage of CD4⁺ cells positive for IL-4 (Figure 3a, $r = -0.415$, $P = 0.009$), IL-5 (Figure 3b,

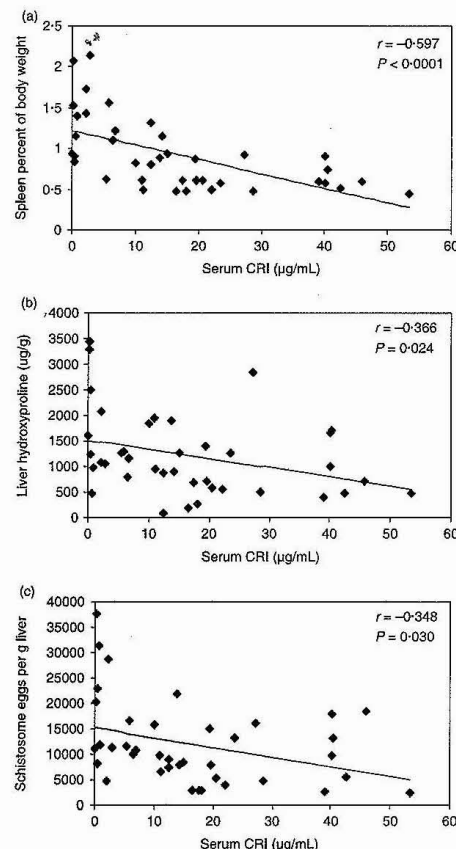


Figure 1 Correlation between cross-reactive idiotype (CRI) levels and percentage of spleen to (a) body weight, (b) liver hydroxyproline, and (c) liver egg counts at 8 weeks of infection. Mice infected with *Schistosoma mansoni* for 8 weeks were sacrificed and their levels of CRI, measured by competitive ELISA (using a standard curve to calculate CRI levels in $\mu\text{g/mL}$) were compared to three different measurements reflective of morbidity. The data are from four different infections of 10 mice each.

$r = -0.478$, $P = 0.002$) and GM-CSF (Figure 3c, $r = -0.498$, $P = 0.001$). Thus, the more likely an animal is to eventually develop severe chronic morbidity (i.e. the lower their serum CRI) the higher the percentage of cells in their spleens that are producing detectable levels of IL-4, IL-5 and GM-CSF at 8 weeks of infection. In contrast, the proportion of CD4⁺ spleen cells producing TNF- α at 8 weeks of infection (Figure 3d,

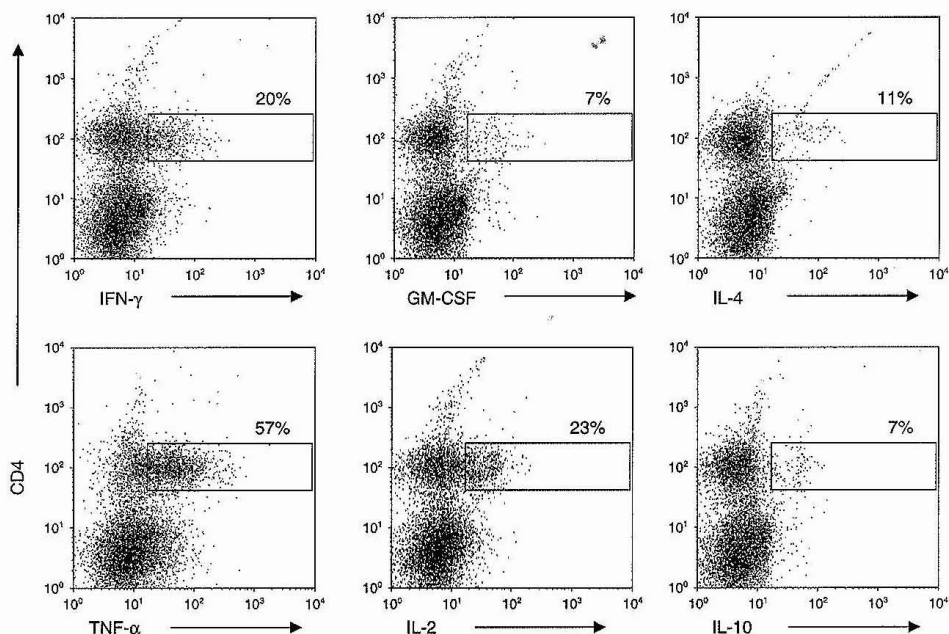


Figure 2 Representative flow cytometry plots of intracellular cytokine staining. The box represents the area containing cells considered positive for both CD4 and the cytokine. The numbers represent the percentage of CD4⁺ cells expressing the cytokine.

$r = 0.492$, $P = 0.002$) was directly correlated with the CRI present in sera and therefore with the predicted development of a less severe chronic morbidity. No statistically significant positive or negative correlations were observed at 8 weeks of infection between CRI and per cent CD4⁺ cells expressing IL-2 ($r = 0.177$, $P = 0.294$), IL-10 ($r = 0.070$, $P = 0.678$), or IFN- γ ($r = -0.137$, $P = 0.413$) or for any CD8⁺ cell intracellular cytokine levels (data not shown).

Correlations of stimulated NO production with serum CRI

Enzymes regulating L-arginine metabolism influence pathogenesis in mice with schistosomiasis (20). L-arginine processed by the arginase and ornithine-aminotransferase pathway leads to proline and fibrogenesis; L-arginine-metabolized NO synthase-2 leads to production of NO and citrulline. To evaluate the potential relationship of CRI in regard to these pathways, we looked at the association between serum CRI and NO production by peritoneal cells after stimulation by anti-CD3, SEA or MSS Id. A significant and strong correlation was observed between levels of serum CRI at 8 weeks of

infection and MSS Id-stimulated NO (Figure 4a, $r = 0.676$, $P < 0.001$). Correlations were also strong between anti-CD3-stimulated (Figure 4b, $r = 0.504$, $P = 0.014$) and SEA-stimulated (Figure 4c, $r = 0.573$, $P = 0.004$) NO and CRI levels.

DISCUSSION

In humans, chronic schistosomiasis usually presents as one of two clinical forms. The majority of patients experience a relatively mild 'intestinal' form, which is characterized by limited (non-life threatening), subtle morbidity (1). Other individuals develop a more severe 'hepatosplenic' disease, which is characterized by periportal fibrosis, splenomegaly, portal hypertension, ascites, collateral circulation, oesophageal varices, and haematemesis (2). It has been hypothesized that the chronic, well-tolerated, 'intestinal' form of schistosomiasis is associated with the establishment and maintenance of a variety of immunoregulatory mechanisms. In contrast, hepatosplenic disease is thought to result from a lack of immunoregulation (3).

The existence of two pathophysiological syndromes in chronic experimental schistosomiasis (7) has facilitated the

C. B. C tre-Sossah et al.

Parasite Immunology

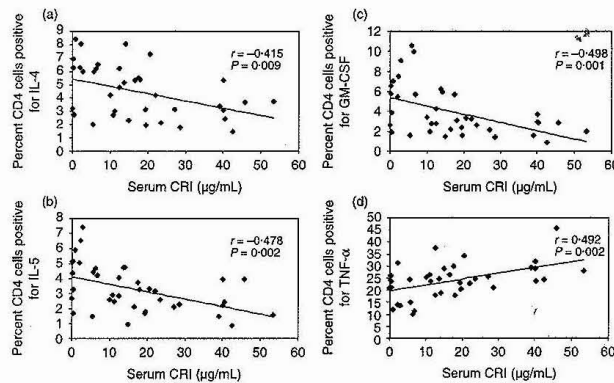


Figure 3 Correlation between CRI levels and percentages of (a) CD4⁺/IL-4⁺ cells, (b) CD4⁺/IL-5⁺ cells, (c) CD4⁺/GM-CSF⁺ cells, and (d) CD4⁺/TNF- ⁺ at 8 weeks of *S. mansoni* infection. Spleens were removed and prepared individually. Spleen cells were stimulated for 4 h with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of GolgiStop (PharMingen, San Diego, CA, USA). Cells were then stained as described in Materials and Methods and analysed by flow cytometry. The data represent three different infections of 10 mice each.

study of pathogenesis and immunoregulation in schistosomiasis as the disease progresses to the chronic stage. Using this model, we have been particularly interested in the relationships between cytokine profiles and the potential immunoregulatory role(s) of CRI in experimental schistosomiasis (9,12–14). Initially, we expected that differences in MSS and HSS development would not be observed prior to 10–12 weeks after infection, the time when modulation of granulomatous pathology is initially observed (4). However, our recent data have led us to believe that the important immunological events that dictate whether or not severe chronic pathology eventually develops occur much earlier in infection, soon after initial exposure of the host to schistosome eggs. CRI, a set of idiotypic antibodies produced by MSS mice or humans with intestinal schistosomiasis, but not by HSS mice or humans with hepatosplenic disease (10,11), can be detected in the sera of mice that subsequently develop MSS as early as 6 weeks after infection (9). Moreover, the 6-week level of CRI showed strong negative correlations with splenomegaly, hepatic eggs, and hepatic hydroxyproline levels, but was not correlated with worm burdens (9). The present study confirmed these observations by demonstrating that increased CRI also correlated with decreased pathology at 8 weeks after infection (Figure 1).

Because serum CRI early in infection is an excellent predictor of subsequent pathology, we wished to utilize this tool to define which immune responses may be important early in infection for determining eventual pathological consequences. We were not surprised to discover that cells producing IL-4, IL-5, and GM-CSF were correlated with measures predictive of chronic severe pathology (low CRI levels), because Th2 cytokines have been repeatedly implicated in granuloma formation and fibrogenesis (21–24). Evaluation of intracellular IL-13 would also have been interesting, but we

did not have access to the antibodies to test for its presence. We had expected that IFN-  and/or IL-10 would be positively correlated with CRI levels, because these cytokines have been shown to regulate granuloma formation (25–32) and we have previously observed associations of IFN- , IL-10 and the less severe (MSS) disease phenotype (12–14,33). However, this was not the case, perhaps in part because of our focus on CD4⁺ T cells in these studies. Although IFN-  and IL-10 are produced by CD4⁺ T cells, their production by other cell types during schistosomiasis may also account for their immunoregulatory role in granuloma formation (32,34).

Another surprising aspect of our data was the direct correlation of TNF-  production and CRI levels. Previously, we have observed that livers of HSS animals (that lack CRI) produce more TNF-  than the livers of CRI⁺ MSS mice (35), consistent with other studies suggesting that TNF-  promotes schistosomiasis pathology in mice and humans (31,36). Again the discrepancy between our expected and our actual results may in part result from differences in cell types, organs (spleen vs. liver), and/or times after infection (8 weeks vs. 20 weeks) between the two studies. However, other studies suggest that TNF-  participates with IL-12 and IFN-  to reduce liver pathology (29,37). Specifically, TNF- , along with IFN- , up-regulates NO synthase-2 expression, resulting in the metabolism of L-arginine to NO and citrulline (20,38). Metabolism of L-arginine via the alternative arginase pathway, which is up-regulated by IL-4, IL-13, and GM-CSF, can lead to increased production of proline and to collagen deposition. Thus, the association of TNF-  and NO production with increased levels of immunoregulatory CRI is consistent with decreased pathology in chronic schistosomiasis.

Although the correlations of cellular responses described here with other markers that predict disease form in chronic schistosomiasis are informative, they are only correlative

Volume 29, Number 5, May 2007

Immune responses in chronic schistosomiasis

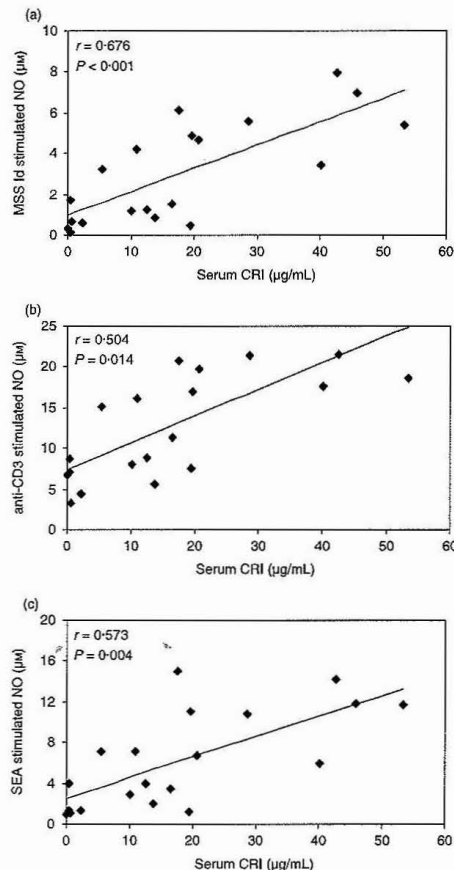


Figure 4 Correlations between CRI levels and levels of NO after stimulation of peritoneal cells with (a) idiotype preparations from sera of moderate splenomegaly syndrome mice (MSS Id), (b) anti-CD3, or (c) soluble *S. mansoni* egg antigen (SEA). Peritoneal cells were cultured and stimulated for 48 h. The supernatants were collected and assayed to quantify the NO levels by the Griess reaction. The data represent two different infections of 10 mice each.

and indirectly indicate that these responses may regulate the pathogenesis and morbidity ultimately seen in chronic infection. Our belief that CRI plays a role in this immunoregulation is supported by studies from other investigators that demonstrate a requirement for B cells and Fc receptors in down-

regulation of granulomatous pathology (39,40). In this study we report that CRI (MSS-Id) stimulates the synthesis of NO by peritoneal cells from mice with high levels of CRI. It is possible that this may implicate CRI further in a causative role in regulatory processes involved with curtailing fibrosis. We also hypothesize that changes in CRI levels precede and influence cytokine production profiles, but the current data do not lead to definitive conclusions about the sequence. However, what we do find intriguing is how early in infection these events that appear to shape chronic pathology are evident.

We have repeatedly demonstrated that the difference between MSS and HSS phenotype at chronic infection is not a function of worm burden. In contrast, in some of our studies (12), we also observed that HSS mice often, but not always, had more eggs per gram of liver than MSS animals. This relationship is seen again in Figure 1 (c). Like the relationship between CRI and cytokines, whether early CRI results in decreased egg production, or whether increased early egg production results in decreased CRI remains a critical question. Again, we favour the former explanation based on our experimental results, but as yet do not have absolute proof. Nevertheless, we anticipate that answering these questions will expand our understanding of the regulation of chronic pathogenesis during schistosomiasis and eventually provide useful means for early detection of and intervention in severe schistosomiasis, as a part of public health campaigns against this chronic intravascular disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to dedicate this manuscript to the memory of George L. Freeman, Jr. The authors thank Dr Lisa Ganley-Leal for assistance in creating the representative flow cytometry figure. This investigation received financial assistance from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Catherine Cêtre-Sossah was funded by a fellowship from the French Medical Research Foundation. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

REFERENCES

- 1 King CL, Dickman K & Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 2005; **365**: 1561–1569.
- 2 van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica* 2003; **86**: 125–139.
- 3 Colley DG, Garcia AA, Lambertucci JR *et al.* Immune responses during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness

- in patients with hepatosplenic disease. *Am J Trop Med Hyg* 1986; **35**: 793–802.
- 4 Pearce EJ & MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 499–511.
 - 5 Vennervald BJ & Dunne DW. Morbidity in schistosomiasis: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2004; **17**: 439–447.
 - 6 Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA & Montenegro SML. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* 2006; **22**: 85–91.
 - 7 Henderson GS, Nix NA, Montesano MA et al. Two distinct pathological syndromes in male CBA/J inbred mice with chronic *S. mansoni* infection. *Am J Pathol* 1993; **142**: 703–714.
 - 8 Freeman GL Jr, Montesano MA, Secor WE, Colley DG, Howard MJ & Bosshardt SC. Immunopathogenesis and immunoregulation in schistosomiasis. Distinct chronic pathologic syndromes in CBA/J mice. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **797**: 151–165.
 - 9 Montesano MA, Colley DG, Willard MT, Freeman GL Jr & Secor WE. Idiotypes expressed early in experimental *Schistosoma mansoni* infections predict clinical outcomes of chronic disease. *J Exp Med* 2002; **195**: 1223–1228.
 - 10 Montesano MA, Freeman GL Jr, Gazzinelli G & Colley DG. Expression of cross-reactive, shared idiotypes on anti-SEA antibodies from humans and mice with schistosomiasis. *J Immunol* 1990; **145**: 1002–1008.
 - 11 Montesano MA, Lima MS, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G & Colley DG. Immune response during human schistosomiasis mansoni. XVI. Idiotype differences in antibody preparations from patients with different clinical forms of infection. *J Immunol* 1989; **142**: 2501–2506.
 - 12 Montesano MA, Colley DG, Eloi-Santos S, Freeman GL Jr & Secor WE. Neonatal idiotype exposure alters subsequent cytokine, pathology and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J Exp Med* 1999; **189**: 637–645.
 - 13 Colley DG, Montesano MA, Freeman GL Jr & Secor WE. Infection-stimulated or perinatal-initiated idiotype interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes Infect* 1999; **1**: 517–524.
 - 14 Montesano MA, Colley DG, Freeman GL Jr & Secor WE. Neonatal exposure to idiotype induces *Schistosoma mansoni* egg antigen-specific cellular and humoral immune responses. *J Immunol* 1999; **163**: 898–905.
 - 15 Cheever AW & Warren KS. Hepatic blood flow in mice with acute hepato-splenic schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; **5**: 406–412.
 - 16 Bergman I & Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 1963; **35**: 1–5.
 - 17 Cheever AW, Finkelman FD, Caspar P, Heiny S, Macedonia JG & Sher A. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J Immunol* 1992; **148**: 3244–3248.
 - 18 Colley DG, Cook JA, Freeman GL Jr, Bartholomew RK & Jordan P. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterologous antigenic preparations from schistosome eggs, worms, and cercariae. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1977; **53**: 420–433.
 - 19 Carter CE & Colley DG. An electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigenic preparation. *J Parasitol* 1978; **64**: 285–290.
 - 20 Hesse M, Modolell M, La Flamme AC et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of 1-arginine metabolism. *J Immunol* 2001; **167**: 6533–6544.
 - 21 Pearce EJ, Caspar EJ, Grzych JM, Lewis FA & Sher A. Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1991; **173**: 159–166.
 - 22 Grzych JM, Pearce E, Cheever A et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1991; **146**: 1322–1327.
 - 23 Kaplan MH, Whitfield JR, Boros DL & Grusby MJ. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J Immunol* 1998; **160**: 1850–1856.
 - 24 Jankovic D, Kullberg MC, Noben-Trauth N et al. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J Immunol* 1999; **163**: 337–342.
 - 25 Sher A, Fiorentino D, Caspar P, Pearce E & Mosmann T. Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 1991; **147**: 2713–2716.
 - 26 Lukacs NW & Boros DL. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; **68**: 57–63.
 - 27 Wynn TA, Jankovic D, Hieny S et al. IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of exogenous IFN- γ . *J Immunol* 1995; **154**: 3999–4009.
 - 28 Falcao PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA et al. Human schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. *Parasite Immunol* 1998; **20**: 447–454.
 - 29 Hoffman KF, Caspar P, Cheever AW & Wynn TA. IFN- γ , IL-12, and TNF- α are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J Immunol* 1998; **161**: 4201–4210.
 - 30 Mountford AP, Coulson PS, Cheever AW, Sher A, Wilson RA & Wynn TA. Interleukin-12 can directly induce T-helper 1 responses in interferon- γ (IFN- γ) receptor-deficient mice, but requires IFN- γ signaling to downregulate T-helper 2 responses. *Immunology* 1999; **97**: 588–594.
 - 31 Henri S, Chevillard C, Mergani A et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease. *J Immunol* 2002; **169**: 929–936.
 - 32 Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperation IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 3157–3166.
 - 33 Bosshardt SC, Freeman GL Jr, Secor WE & Colley DG. IL-10 deficit correlates with chronic, hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1997; **19**: 347–353.
 - 34 Velupillai P, Secor WE, Horauf AA & Harn DA. B-1 Cell (CD5⁺, B220⁺) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and largely due to activation by polylectosamine sugars. *J Immunol* 1997; **158**: 338–344.
 - 35 Adewusi OI, Nix NA, Lu X, Colley DG & Secor WE. *Schistosoma*

Volume 29, Number 5, May 2007

Immune responses in chronic schistosomiasis

- mansoni*: relationship of tumor necrosis factor-alpha to morbidity and collagen deposition in chronic experimental infection. *Exp Parasitol* 1996; **84**: 115–123.
- 36 Joseph AL & Boros DL. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J Immunol* 1993; **151**: 5461–5471.
- 37 Oliveira DM, Silva-Teixeira DN & Goes AM. Evidence for nitric oxide action on *in vitro* granuloma formation through pivotal changes in MIP-1 α and IL-10 release in human schistosomiasis. *Nitric Oxide* 1999; **3**: 162–171.
- 38 Modolell M, Corraliza I, Link F, Soler G & Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1101–1104.
- 39 Ferru I, Roye O, Delacre M, Auriault C & Wolwiczuk I. Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni*: demonstration of the participation of B cell in granuloma modulation. *Scand J Immunol* 1998; **48**: 233–240.
- 40 Jankovic D, Cheever AW, Kullberg MC *et al.* CD4⁺ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *J Exp Med* 1998; **187**: 619–629.

Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS₁-rDNA sequences

A. PERRIN¹, C. CETRE-SOSSAH¹, B. MATHIEU³, T. BALDET¹,
J.-C. DELECOLLE² and E. ALBINA¹

¹CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, Montpellier, ²Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée zoologique, Strasbourg and ³Entente Interdépartementale pour la Démoustication, Montpellier, France

Abstract. Biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) play important roles in the transmission of viral diseases affecting wild and domestic ruminants and horses, including Bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) respectively. In southern Europe, BT has been largely transmitted by the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer. However, other species such as *C. obsoletus* Meigen, *C. scoticus* Downs & Kettle and *C. pulicaris* Linné may also be involved in BTV transmission. As a consequence of the discovery of *C. imicola* followed by BTV-2 outbreaks on the island of Corsica in October 2000, further studies on these biting midges have been carried out. To better characterize the evolution and phylogenetic relations of *Culicoides*, molecular analysis in parallel with a morphology-based taxonomic approach were performed. Phylogenetic analyses of French *Culicoides* species were undertaken using the ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer 1 (ITS₁) as a molecular target. This region was shown to be useful in understanding evolutionary and genetic relationships between species. Construction of several trees showed that molecular phylogeny within the genus *Culicoides* correlates not only with morphological-based taxonomy but also with ecological patterns.

Key words. *Culicoides* spp., African horse sickness, Bluetongue, internal transcribed spacer 1, phylogeny, France.

Introduction

Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are vectors of devastating viral diseases of livestock and wildlife, such as Bluetongue (BT), African horse sickness (AHS) and epizootic haemorrhagic disease of deer (EHD) (Du Toit, 1944; Tabachnick *et al.*, 1992; Mellor & Boorman, 1995; Mellor *et al.*, 2000). These diseases affecting ruminants and equines are caused by arthropod-borne viruses of the *Orbivirus* genus within the Reoviridae family (Holmes *et al.*, 1995). They are maintained in nature through series of alternating cycles of replication between its *Culicoides* vectors and susceptible hosts (Takamatsu *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005). The health and economic impact of BT and AHS are important enough to include them within

the 15 priority diseases of list A of the 'Office International des Epizooties' (OIE, World Animal Health Organization).

BT is endemic in America, Australia, Asia and Africa. However, by 1999–2000 it had spread to southern Europe (Spain, France, Italy and Greece) where it has caused the death of one million sheep and an overall estimated economical loss of 300 000 euros/year (Tabachnick *et al.*, 1996; Mellor & Wittmann, 2002). The disease has now become endemic in Spain, France and Italy (Baylis, 2002; Sarto i Monteys *et al.*, 2005). The introduction of BT in Europe was the consequence of the spread of *Culicoides imicola* Kieffer from Africa. This species is now established in southern Europe. The reason for this recent northern extension of a tropical and subtropical vector is unknown but could be related to global warming (Purse *et al.*, 2005).

Correspondence: Catherine Cêtre-Sossah, CIRAD-EMVT, Campus International de Baillarguet, TA30/G, 34398 Montpellier Cedex 5, France, Tel.: + 33 467593724; fax: + 33 467593798; e-mail: catherine.cetre-sossah@cirad.fr

220 A. Perrin et al.

More than 1200 *Culicoides* species have been listed in the world (Borkent & Wirth, 1997) but only 17 have been associated with BTV transmission (Mellor, 1990; Mo *et al.*, 1994; Bi *et al.*, 1996; Sendow *et al.*, 1996; Sukarsik *et al.*, 1996; Venter *et al.*, 1998). The major vector species are *C. imicola* and *C. bolitinos* Meiswinkel in Africa, *C. imicola* in Asia, *C. brevitarsis* Kieffer in Australia, *C. sonorensis* Wirth & Jones in North America, *C. insignis* Lutz and *C. pusillus* Lutz in South and Central America and *C. imicola* in Europe (Meiswinkel, 1989; Mellor, 1990).

However, epidemiological field investigations and/or virus detections on *Culicoides* in the Mediterranean basin led to species other than *C. imicola* being suspected in the transmission of BT virus. These potential alternative vectors are members of the *Obsoletus* complex (Mellor & Pitzolis, 1979; Mellor & Wittmann, 2002) and *Pulicaris* complex (Wittmann & Baylis, 2000; Anon, 2001; Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003). De Liberato *et al.* (2005) have recently highlighted the abundance and the role of *C. obsoletus* as vector of bluetongue in Italy.

The discovery of *C. imicola* in the island of Corsica (France) in October 2000 (Zientara *et al.*, 2001; Delécolle & de La Rocque, 2002), followed by the emergence of BT outbreaks a few weeks later, and the relatively high risk of occurrence of this vector in neighbouring coastal mainland in southern France (Wittmann *et al.*, 2001; Tatem *et al.*, 2003) have resulted in the development of entomological surveys in these areas. For this purpose, a large light-trap network was established in 2002 in southern mainland France to survey the possible settlement of *C. imicola* and study the population dynamics of other potential vectors species: *Obsoletus* complex and *Pulicaris* complex (Baldet *et al.*, 2004). Besides the morphological determination of the different *Culicoides*, a better characterization of *C. imicola* was sought, particularly of the phylogenetic relationships between the different *Culicoides* species identified in Corsica and southern mainland France.

ITS₁ (internal transcribed spacer 1) located between genes 18S and 5.8S, on nuclear ribosomal DNA were chosen to be reliable molecular tools to work with because its structural and evolutionary properties are well known (Elder & Turner, 1995). In most cases, gene and ITS sequences at the many different copies of the ribosomal locus remain of a similar sequence composition (Ritchie *et al.*, 2004). It has to be mentioned here that some studies of spacer regions have found intragenomic diversity due to inefficiencies in homogenization (Schlötterer & Tautz, 1994), historical population fragmentation (Vogler & Desalle, 1994) or cryptic speciation (Leo & Barker, 2002). ITS₁ has already been used not only for different insects (Gentile *et al.*, 2002) but also for *Culicoides* (Li *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2004).

The aim of the present work was to assess the phylogenetic status of *C. imicola* within other native *Culicoides*. Molecular and morphological taxonomy of *Culicoides* were compared. Finally, potential relationships between phylogenetic analysis

and habitat characteristics of the *Culicoides* and also their potential role as bluetongue vectors are discussed.

Materials and methods

Traps and collection

To detect the introduction of *C. imicola* into mainland France at an early stage, 19 sites were selected for insect trapping. These sites were spread over 50-km intervals along the French Mediterranean coast. The collection was carried out at night once per month at each site from April to November 2002, using standard UV light-traps with a suction fan. Traps were set between 1 h before nightfall to around 8.00 h the following morning. They were located outdoors, 1.5–2 m above the ground and at 25 m maximum from livestock. A glass collecting beaker containing 200–300 mL of water (with a drop of detergent to reduce surface tension) was placed at the base of each trap. Insect collections were transported to the laboratory in the water-filled collecting beaker and then recovered and preserved in 90% ethanol. Ceratopogonidae were first isolated from all other insects. Identification of *Culicoides* was initially based upon the wing pattern, and confirmed subsequently by mounting some specimens on microscope slides (Kremer, 1965; Wirth & Marston, 1968). The samples were identified morphologically by two of the authors (B.M. and J.C.D.) using the keys of Campbell & Pelham-Clinton, (1960) and Delécolle (1985).

Extraction of genomic DNA

Three specimens of *Culicoides* species for most species were used for the extraction of DNA (see Table 1 for the number of specimens analysed per species depending on the availability of the midge). Total genomic DNA was extracted with the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.) according to the manufacturer.

Polymerase chain reaction primers

The gene analysis software Vector NTI (Invitrogen, CA, U.S.A.) was used to compare the ITS₁ rDNA sequences of the 11 species of *Culicoides* retrieved from GenBank/EMBL databases for the design of primers. A set of primers (PanCulF/PanCulR) was designed for a genus-specific polymerase chain reaction (PCR). The primers are PanCulF, 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3', a shorter version (at the 5' end) of the 18S universal primer used to amplify other arthropods including mites (Lava Kumar *et al.*, 1999), and PanCulR, 5'-TGCGGTCTTCATCGAACCCAT-3', a *Culicoides* specific primer previously described (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004).

© 2006 The Authors

Journal compilation © 2006 The Royal Entomological Society, *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 219–228

Table 1. Collection of *Culicoides* species used in this study

<i>Culicoides</i> species	Collection locality	Geographic coordinate†	Total number of specimens	% homologies	Number of haplotypes
<i>C. cataneii</i>	Vence (06)	7°05'57" E/43°43'25" N	3	97.2%	5
<i>C. circumscriptus</i>	Lesey (57)	6°38'00" E/48°45'00" N	2	98.7%	3
<i>C. derisor</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. festivipennis</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	3	98.8%	4
<i>C. griseidorsum</i>	La Crau (83)	6°02'57" E/43°07'51" N	3	99.6%	3
<i>C. heteroclitus</i>	Roquebrune s/ Argens (83)	6°38'23" E/43°26'51" N	2	77.1%	3
<i>C. imicola</i>	Calvi (2A)	6°42'36" E/42°54'89" N	3	99.8%	3
<i>C. indistinctus</i>	Menton (06)	7°29'05" E/43°47'38" N	1*		
<i>C. kibunensis</i>	St Martin de Londres (34)	3°47'40" E/43°47'26" N	1*		
<i>C. kurensis</i>	St Mitre les remparts (13)	5°00'06" E/43°26'18" N	3	93.6%	4
<i>C. lupicaris</i>	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3	98.1%	4
<i>C. malevillei</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. maritimus</i>	Salses (66)	2°57'13" E/42°49'25" N	1	99.8%	4
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3		
<i>C. newsteadi</i>	St Mitre les remparts (13)	5°00'06" E/43°26'18" N	3	95.9%	5
<i>C. obsoletus</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	1	99.2%	7
	Castelet (83)	5°45'31" E/43°12'16" N	1		
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	2		
<i>C. parroti</i>	Les Pennes-mirabeau (13)	5°16'20" E/43°24'13" N	1	99.5%	4
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3		
<i>C. pictipennis</i>	Geispolsheim (67)	7°38'04" E/48°29'05" N	3	95.2%	4
<i>C. picturatus</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. pulicaris</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	3	95.9%	7
<i>C. punctatus</i>	Geispolsheim (67)	7°38'04" E/48°29'05" N	3	94.8%	4
<i>C. puncticolis</i>	Vic-la-Gardiole (34)	3°46'33" E/43°28'53" N	1	97.9%	4
	Aigues-Mortes (34)	4°09'26" E/43°33'38" N	2		
<i>C. sahariensis</i>	Portiragnes (34)	3°20'16" E/43°17'00" N	1	97.5%	3
	Vic la gardiole (34)	3°46'33" E/43°28'53" N	2		
<i>C. scoticus</i>	Roquette s/ Siagne (06)	6°56'07" E/43°34'38" N	2	93.8%	8
	Castelet (83)	5°45'31" E/43°12'16" N	2		
<i>C. subfagineus</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	3	96.6%	4
<i>C. submaritimus</i>	Salses (66)	2°57'13" E/42°49'25" N	3	99.2%	4

*Indicates the species where only one specimen was available.

†Longitude/latitude, UTM WGS 84.

Polymerase chain reaction amplification of internal transcribed spacer 1

The ITS₁ of each of the 25 species of *Culicoides* was amplified by genus-specific PCR using primers PanCulF/PanCulR. Reactions for the PanCulF/PanCulR primers were performed in a total volume of 50 µL consisting of 10 × PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer and 2.5 U Taq DNA polymerase under the following thermocycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min, then 30 cycles at [94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min] and a final extension phase at 72°C for 10 min. A volume of 1 µL of genomic DNA was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide and purified using PCR Purification Kit (Qiagen, U.S.A.) according to the manufacturer.

Cloning the internal transcribed spacer 1 fragments

The purified PCR product was cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), using chemically competent *Escherichia coli*. To confirm the presence of the insert, PCR amplification with PanCulF/PanCulR primers was performed on 10 bacterial clones for each species. Three plasmids per specimen were kept for further analysis. The plasmid DNA was extracted using Plasmid DNA Preparation Kit (Nucleospin R Plasmid, Macherey Nagel, Düren, Germany).

Sequencing

Three clones for each of the three *Culicoides* specimens per species (for most species) were sequenced with both PanCulF and PanCulR primers. Reactions were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, MA, U.S.A.) in a total

222 A. Perrin et al.

volume of 20 µL consisting of 5 × buffer, 3.2 pmol of each primer, 2.5 U of BigDye mix and 300 ng of DNA.

DNA products were precipitated (2 µL of sodium acetate 3 M, pH 4.6, and 40 µL of absolute ethanol) and washed in 70% ethanol. The pellet was resuspended in a final volume of 4 µL (mix of 5 vol. of formamide and 1 vol. of EDTA/blue dextran) and loaded on Automatic sequencer ABI Prism 377.

Sequence analysis and alignment

A consensus ITS₁ sequence was obtained from the nine different sequences (three distinct specimens with three clones for each specimen) and submitted to GenBank with an appropriate accession number (Table 2). This consensus sequence was the one used for the phylogeny.

Table 2. GenBank accession numbers of previously and newly sequenced *Culicoides* species

<i>Culicoides</i> species	Accession number
Previously sequenced	
<i>C. albicans</i>	AJ417980
<i>C. arakawai</i>	AJ489503
<i>C. cubitalis</i>	AJ417979
<i>C. griseus</i>	AJ417987
<i>C. impunctatus</i>	AJ417986
<i>C. maritimus</i>	AJ417981
<i>C. nubeculosus</i>	AJ417982
<i>C. pulicaris</i>	AJ417983
<i>C. punctatus</i>	AJ417984
<i>C. variipennis</i>	U48380
<i>C. imicola</i>	AF071949
Newly sequenced	
<i>C. catanei</i>	AY861139
<i>C. circumscriptus</i>	AY861163
<i>C. derisor</i>	AY861140
<i>C. festivipennis</i>	AY861141
<i>C. griseidorsum</i>	AY861142
<i>C. heteroclitus</i>	AY861143
<i>C. imicola</i>	AY861144
<i>C. indistinctus</i>	AY861145
<i>C. kibunensis</i>	AY861146
<i>C. kurensis</i>	AY861147
<i>C. lupicaris</i>	AY861148
<i>C. malevillei</i>	AY861149
<i>C. maritimus</i>	AY861150
<i>C. newsteadi</i>	AY861151
<i>C. obsoletus</i>	AY861152
<i>C. parroti</i>	AY861153
<i>C. pictipennis</i>	AY861154
<i>C. picturatus</i>	AY861155
<i>C. pulicaris</i>	AY861156
<i>C. punctatus</i>	AY861157
<i>C. puncticollis</i>	AY861158
<i>C. sahariensis</i>	AY861159
<i>C. scoticus</i>	AY861160
<i>C. subfagineus</i>	AY861161
<i>C. submaritimus</i>	AY861162

The alignment of the forward and reverse sequences was performed using Vector NTI software (Informax Inc.). Sequences from different midges were aligned and base differences between sequences identified. All sequences were aligned without gaps. The identity of all polymorphic bases was checked against the original chromatograms. Intraspecific variation is very low. The file format msf (*.msf) obtained after alignment by Vector NTI was converted in a phylip 3.2 format (*.phy) using BIOEDIT software to allow phylogenetic analysis (Hall, 1999).

Phylogenetic analysis

Different methods of tree constructions were performed to probe the robustness of our resulting hypotheses. These methods were neighbour-joining, maximum likelihood and a Bayesian inference. Phylogenetic analysis was carried out using the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) method with Darwin software (Perrier *et al.*, 2003). Distances were adjusted for multiple substitutions using Jukes and Cantor correction and generated with TREECON MATRIXW program of Darwin (Van de Peer & De Wachter, 1993). Bootstraps were determined on 2000 replicates.

Bayesian inference was performed using MrBAYES version 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) with random starting trees and run for 2 000 000 generations, sampling the Markov chains at intervals of 100 generations. Four heated Markov chains (using default heating values) were used. A total of 1000 out of the 20 000 resulting trees were discarded as 'burn-in'. Support for tree nodes was determined based on the values of Bayesian posterior probability (BPP) obtained from a majority-rule consensus tree. We repeated the analysis five times to confirm that the results converged to the same topology.

Maximum likelihood (Felsenstein, 1973, 1981, 1988) analysis was performed using PHYLIP (DNAML program). Nodal support was estimated by bootstrap analysis (Seqboot option). The complete ITS₁ sequence of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) (GenBank Accession Number: X67157) was used as the outgroup.

Statistics

To get an overall analysis, all data molecular sequencing, ecology and taxonomy were combined using multiple correspondence statistical analysis with the R 2.0-1 package and ade4 1.3-3 library. This program is used for analysis of environmental data (Tenenhaus & Young, 1985; Lebart *et al.*, 1995). The aim of the analysis is to separate the modalities of variables in the best way and to generate distinct groups. Multiple correspondence analysis (MCA) aim is to generate quantitative scores, which maximize the mean correlation ratio among complex quantitative variables.

Results and discussion

Collection of *Culicoides*

The genus *Culicoides* in this study was represented by 25 species whose specimens were collected between 2002 and 2004 in different geographical locations (Table 1). The *C. imicola* specimen used as reference was collected in Corsica in 2002. All specimens gave amplified ITS₁ products between 300 and 500 bp.

Internal transcribed spacer 1 polymerase chain reaction amplification and sequences of *Culicoides*

In order to determine the position of the newly introduced *C. imicola* within other *Culicoides* species present in France, we sequenced ITS₁ regions and performed phylogenetic analysis on these sequences. This ITS₁ region was chosen based on previous works demonstrating the possibilities of phylogenetic analysis on *Culicoides* (Li *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2004). ITS₁ sequences from each of the 25 specimens listed in Table 1 were generated by PCR using PanCulF and PanCulR primers (previously described in Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). The previously published ITS₁ sequences were retrieved from GenBank (Table 2).

Variations were first observed between sequences from species already published and some of the sequences presented here, leading to different positions in the trees. The *Maritimus* Kieffer ITS₁ sequence specimen retrieved from GenBank (AJ417981) was only 57% homologous with the specimen we have analysed. However, different specimens of *C. maritimus* were analysed and it was found that they were more than 99.8% homologous. In addition, the GenBank sequence of *C. maritimus* [named *C. maritimus* (2) in Fig. 1] could be considered as an out-group compared to all other *Culicoides*, thus strongly suggesting that this sequence is not reliable, probably because of a misidentification of the species. Different species in the *C. maritimus* complex have been described and are difficult to differentiate (*C. maritimus* ss, *C. maritimus paucisensillatus* for example). A more limited sequence variation was observed within the species *C. pulicaris* and *C. punctatus*, with 87% and 66% of homology, respectively. These differences may be due either to the different geographical distribution of the two specimens of each species (France vs. Scotland), showing that they are issued from two different genotypes, or to the problem of morphological identification. The species *C. cubitalis* and *C. kibunensis* were expected to be identical, which was actually not the case (67.7% of homology). To illustrate the complexity of *Culicoides* identification, another complex occurring in the U.S.A., the *Variipennis* complex is also made of five different species, called *C. variipennis albertensis* (found in the U.S.A. mid-west), *C. variipennis australis* (south-east U.S.A.), *C. variipennis occidentalis* (west and pacific coast U.S.A.), *C. variipennis sonorensis* (south-west U.S.A.), *C. variipennis variipennis* (north-east U.S.A.) (Raich *et al.*, 1993). *Culicoides* species among *Culicoides*

complexes are difficult to differentiate. Taxonomists who are able to manage the specific identification among sibling species are very few, which may easily lead to misidentification (Gomulski *et al.*, 2005).

In order to look at the possible variation within the same species of *Culicoides*, three specimens of *C. imicola* collected in Corsica were analysed and a 99.8% ITS₁ sequence homology was shown. In addition, sequencing of two different specimens collected in the south and the north of Corsica of the same species, has confirmed the conservation of the sequence within a species (data not shown). This illustrates the interest of ITS₁ for the differentiation of species. However, the same target is not appropriate for refined discrimination among specimens of the same species. Ritchie *et al.* (2004) showed that individuals of eight *Culicoides impunctatus* populations, including four geographical areas, appear to have homogenized ITS regions; however, heterogeneity in *C. impunctatus* specimens suggests one genetically distinct population.

Phylogenetic status of *Culicoides*

ITS₁ sequences of the *Culicoides* species already published in GenBank and our new sequences were used for this phylogenetic analysis. Very high sequence homologies percentages were obtained among specimens of each species (Table 1). Maximum likelihood, neighbour-joining and Bayesian inference trees were then inferred and tree topologies were analysed using bootstrapping. ITS₁ sequence of *Anopheles gambiae* (GenBank accession number X67157) was used as outgroup in order to root the tree.

Phylogenetic trees generated using the neighbour-joining (Fig. 1), the Bayesian inference (50% majority rule consensus tree, Fig. 2) and the maximum likelihood methods (best maximum likelihood tree, Fig. 2) were very similar. Bootstrap values from the NJ analysis are indicated above the branches on Fig. 1. Bootstrap values from the maximum likelihood analysis and posterior probabilities for Bayesian analysis are indicated, respectively, above and under the branches of the tree on Fig. 2. They both contained eight (nine for Bayesian inference/maximum likelihood trees) separate clades classifying 31 species. Only five species among the 36 analysed were dispersed all over the classification. Four distinct ecological groups related to some of the clades were also defined. The first ecological group is considered to be halophilic: the species included in this group breeds in saline or brackish substrate. The second group is characterized by species living in altitude and in environments poor in organic materials. The third group includes species living in livestock rearing environment (effluent, manure) and the last one is characterized by environments rich in organic substances.

The eight different clades and their connection to the four ecological groups are described as follows. Clade I contains *C. subfagineus* Delécolle & Ortega 1998 and *C. newsteadi* Austen 1921. These two palaearctic species belong to the same subgenus *Culicoides* as species from

224 A. Perrin et al.

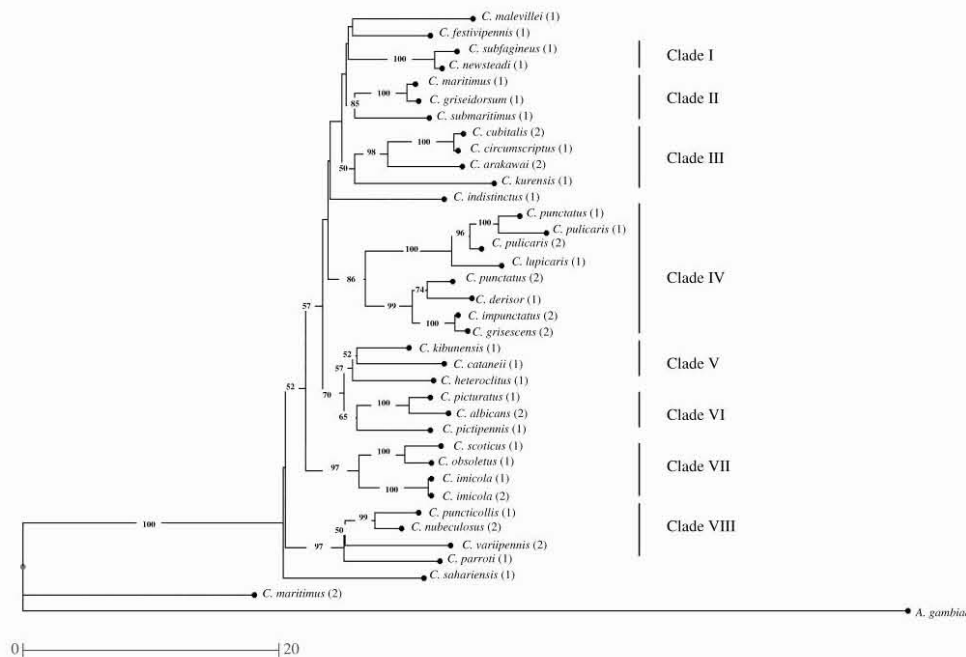


Fig. 1. Phylogenetic relationships among internal transcribed spacer 1 (ITS₁) sequences of *Culicoides* from France. Neighbour-joining tree based on ITS₁ sequences. Bootstrap values (2000 replicates, nodes supported with more than 50%) are given on the branches. The numbers indicated in brackets correspond to (1) the specimens already published in GenBank and (2) the specimens analysed within this work.

clade IV; however, *C. subfagineus* and *C. newsteadi* do not have the same larvae habitat. *C. subfagineus* is probably a species living in wood moisture as *C. fagineus* (a sibling species) whereas *C. newsteadi* is a halophilic species (breeding in saline or brackish substrate), corresponding to the first ecological group.

Clade II contains *C. griseidorsum* Kieffer belonging to *griseidorsum* group, *C. maritimus* and *C. submaritimus* Dzhafarov (both in *maritimus* group). These three species are halophilic, which correspond to the first described ecological group.

Clade III consists of four species: *C. cubitalis* Edwards, recently renamed *kibunensis* Tokunaga (*Kibunensis* group), *C. circumscriptus* Kieffer (subgenus *Beltranmyia* Vargas, 1953), *C. arakawai* Arakawa (subgenus *Meijerehelea*) and *C. kurensis* Dzhafarov (*Kurensis* group). *C. arakawai* is an oriental species that has never been reported in Palearctic area. *C. circumscriptus* breeds in brackish substrate, whereas *C. kibunensis* is a species living in fresh water.

Clade IV consists of *C. lupicaris* Downes and Kettle, *C. pulicaris* Linné, *C. punctatus* Meigen, *C. impunctatus* Goetghebuer, *C. griseus* Edwards and *C. derisor* Callot and Kremer. In maximum likelihood/Bayesian inference

tree this clade is subdivided in two separate branches. All these species belong to the subgenus *Culicoides* except *C. derisor*, which does not belong so far to any morphological classification due to its lack of wing patterns. Clade IV contains species corresponding to the second described ecological group (in altitude and poor in organic substances).

Clade V is characterized by the presence of *C. heteroclitus* Callot & Kremer (*Kibunensis* group), *C. cataneii* Clastrier (*Cataneii* group) and *C. kibunensis* Tokunaga (*Kibunensis* group).

Clade VI includes three species: *C. picturatus* Kremer & Deduit (subgenus *Silvaticulicoides*), *C. pictipennis* Staeger (*Pictipennis* group), *C. albicans* Winnertz (*Vexans* group). Larvae environment of species of clade V and clade VI is unsalted substrates.

Clade VII contains *C. obsoletus* Meigen, *C. scoticus* Downes & Kettle and *C. imicola* Kieffer. *C. imicola* is well known as a competent vector of orbiviruses (bluetongue and African horse sickness), whereas *C. obsoletus* and *C. scoticus* (*Obsoletus* complex) are only suspected vectors for bluetongue (Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005). The habitat of these species is not

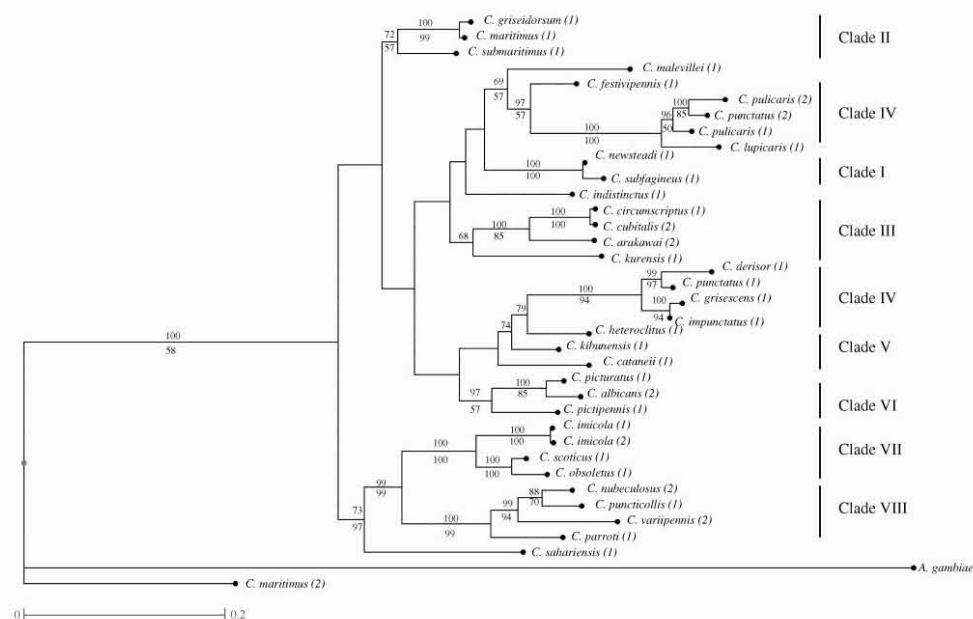


Fig. 2. Phylogenetic relationships among internal transcribed spacer 1 (ITS₁) sequences of *Culicoides* from France. Condensed Bayesian and maximum likelihood tree. Values above the nodes are for posterior probability values (2 000 000 generations), and numbers below the nodes are bootstraps values for maximum likelihood analysis (1000 replicates). The details corresponding to each *Culicoides* specimen are given in Table 1.

clearly defined but is probably related to livestock rearing environments (effluent, manure, moist organically enriched soil) corresponding to the third ecological group. Those three species belong to the same subgenus *Avaritia* Fox, like all species included in the *Imicola* complex. *Imicola* complex is currently represented by 10 species (Sebastiani *et al.*, 2001). Of these 10 species, seven are described: *C. imicola sensu stricto* Kieffer, *C. brevitarsis* Kieffer in Australasia; *C. pseudopallidipennis* Clastrier, *C. nudipalpis* Delfinado, *C. bolitinos* Meiswinkel in southern Africa, *C. miombo* Meiswinkel, *C. loxodontis* Meiswinkel and three undescribed species: *Culicoides* sp. #30 (*C. tutifrutti* Meiswinkel 1995), *Culicoides* sp. #103 and *Culicoides* sp. #107 (*C. kwagga*, Meiswinkel, 1995). ITS₁ sequences from the following species *C. bolitinos*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus*, *C. actoni* and *C. wadai* all included in the same subgenus *Avaritia* are also considered as vectors of bluetongue in their respective geographical area. It could be interesting, besides the morphological taxonomy, to get an extended phylogenetic analysis of those species belonging to the same subgenus.

Clade VIII contains *C. variipennis* Coquillett – a Nearctic species that has never been found in the Palaearctic area, *C. nubeculosus* Meigen, *C. puncticollis* Becker and *C. parroti* Kieffer. All these species belong to the same subgenus

Monoculicoides and live in environments rich in organic substances, corresponding to the last ecological group.

Finally, *C. festivipennis* Kieffer, belonging to *Festivipennis* group, *C. malevillei* Kremer & Coluzzi in *Malevillei* group, *C. sahariensis* Kieffer in *Sahariensis* group, *C. indistinctus* in *Odiatus* group and *C. maritimus* (GenBank: AJ417981) are not included in the 8/9 separate clades described previously. The sequencing of more *Culicoides* species will probably give more branches for these particular groups that could lead to the identification of new clades.

The construction of the phylogenetic trees by two different methods demonstrates similar data and it is therefore possible to easily confirm the position of *C. imicola* in a single clade (clade VII) including *C. scoticus* and *C. obsoletus*; all three species were confirmed or suspected to be bluetongue vectors. Also, they probably breed in the same environment, moist organically enriched soil with tolerance of fairly wide climatic variation.

Multiple correspondence analyses

To combine morphological and molecular analysis and the habitat profile of the *Culicoides* species included in this

226 A. Perrin et al.

study, a multiple correspondence analysis (MCA) was carried out. This MCA was done on the 35 species grouped into clades according to the phylogenetic analysis. *C. derisor* was excluded from MCA because taxonomic and habitat information was missing. As shown in Fig. 3, MCA gave four clusters. Cluster 1 includes *C. imicola*, *C. scoticus* and *C. obsoletus*, which are the three species involved in bluetongue transmission, either as proved or suspected vectors, more likely breeding in the same biotope. Cluster 2 contains eight different species that are halophilic species found in the Mediterranean area: *C. circumscriptus*, *C. puncticollis*, *C. parroti*, *C. maritimus*, *C. griseidorsum*, *C. submaritimus*, *C. nubeculosus* and *C. variipennis*. They all belong to the *Monoculicoides* subgenus and Maritimus group.

Cluster 3 includes 13 species: *C. subfagineus*, *C. festivipennis*, *C. griseus*, *C. cubitalis*, *C. kibunensis*, *C. impunctatus*, *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. picturatus*, *C. pictipennis*, *C. albicans* and *C. newsteadi*. Most of the species included in this cluster belong to the *Culicoides* subgenus and are found in the Palearctic area and are more likely breeding in fresh environments with low salt concentrations. The last cluster, cluster 4, includes the six following species: *C. arakawai*, *C. kurensis*, *C. indistinctus*, *C. sahariensis*, *C. catanellii* and *C. heteroclitus* and is considered as a heterogenic cluster.

This MCA confirms the results shown by the phylogenetic trees, showing the distribution of four different

clusters, with cluster 1 in particular including the three potential or confirmed bluetongue vectors species.

Grouping of *Culicoides* species by molecular analysis of ITS₁ sequences was shown to be in agreement with the morphological taxonomy. This illustrates that ITS₁ can be used as a discriminating tool for *Culicoides* differentiation, in complement or in combination with the morphological determination which remains to be the gold standard for *Culicoides* species identification. Molecular grouping was also found to correlate with data on the habitat of *Culicoides*. For larvae identification, morphology-based distinction between species is very hard because no significant and specific differences among larvae have been described so far. In this case, ITS₁ analysis can represent an alternative tool for a better characterization of the species collected in a particular environment. This will help in increasing the knowledge on the habitat and bioecology of these midges.

Interestingly, the molecular analysis of ITS₁ has grouped *C. imicola*, a true vector of orbiviruses, with two other suspected vector species, *C. obsoletus* and *C. scoticus*, into the same cluster. This shows that these three species are genetically more closely related between them than with other species and because of this proximity, they may share some features, such as a common habitat and competence for orbivirus transmission. Confirmation of the latter possibility is urgent because it may have important consequences of disease spread, *C. obsoletus* being largely

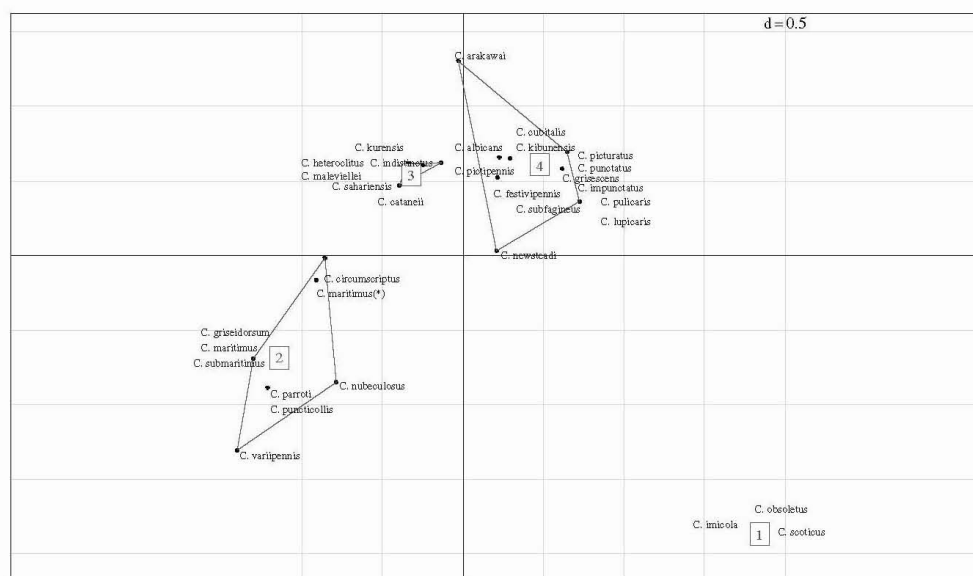


Fig. 3. Multiple correspondence analysis for *Culicoides* data (molecular, ecological and morphological data). The asterisk (*) indicates the specimen already published in GenBank.

the most important and widespread *Culicoides* in Europe (Mellor & Wittmann, 2002).

ITS₁ sequences have been shown to be good phylogenetic markers and could help to produce a bar-coding for each described *Culicoides* species. The description of their biotope and biology can be more challenging if the molecular tools to confirm classification pattern are available.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mr J. Lefebvre from DDSV 2B and Mr G. Bousquet from DDSV 2A for catches in Corsica. Part of the project was funded by FNS-INRA-ACI Ecologie quantitative-Ministère Français de la Recherche.

References

- Anon. (2001) Bluetongue in Bulgaria: follow-up report No. 1. *OIE Disease Information*, **14**, 230–1.
- Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., De La Rocque, S. & Roger, F. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Proceedings of the IX European Multicollaborative of Parasitology, Valencia, Spain*, **40**, 226–231.
- Baylis, M. (2002) The Re-emergence of Bluetongue. *Veterinary Journal*, **164**, 5–6.
- Bi, Y., Li, C., Li, S., Qing, B., Zhong, N., Hu, J. & Yang, R. (1996) An epidemiological survey of bluetongue in Yunnan Province, China. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*, ACIAR Proceedings No. 66 (ed. by T. D. George and P. Kegeo), pp. 51–56. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Borkent, A. & Wirth, W.W. (1997) World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **233**, 1–257.
- Campbell, J.A. & Pelham-Clinton, E.C. (1960) A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B*, **67**, 181–302.
- Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A. et al. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record*, **153**, 71–74.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C. & Albina, E. (2004) Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **35**, 325–37.
- De Liberato, C., Scavia, G. & Lorenzetti, R. et al. (2005) Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Veterinary Record*, **156**, 301–4.
- Delécolle, J.C. (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. PhD Dissertation, Université Louis Pasteur de Strasbourg, UFR Sciences de la vie et de la terre, Strasbourg.
- Delécolle, J.C. & de La Rocque, S. (2002) Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **107**, 371–379.
- Du Toit, R.M. (1944) The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **19**, 7–16.
- Elder, J.F. & Turner, B.J. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology*, **70**, 297–320.
- Felsenstein, J. (1973) Maximum likelihood estimation of evolutionary trees for continuous characters. *American Journal of Human Genetics*, **25**, 471–492.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**, 368–376.
- Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inferences and reliability. *Annual Review of Genetics*, **22**, 521–565.
- Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J.R. & Caccone, A. (2002) Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s. and the problem of taxonomic status. *Genetics*, **161**, 1561–1578.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.-C., Goffredo, M. & Gasperi, G. (2005) Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, **30**, 619–631. 10.1111/j.1365-3113.2005.00286.x
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Holmes, I.H., Boccardo, G., Estes, M.K. & Furuichi, M.K. (1995) Family Reoviridae. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ed. by F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop and S. A. Ghabrial), Vol. **10**, pp. 208–239. Springer, Vienna, Austria.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**, 754–755.
- Kremer, M. (1965) Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. *Encyclopédie d'Entomologie Série A* (ed. by P. Lechevallier), Vol. **39**, p. 299. P. Lechevallier Paris.
- Lava Kumar, P., Fenton, B. & Jones, A.T. (1999) Identification of cecidophyopsis mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347–357.
- Lebart, L., Morineau, A. & Piron, M. (1995) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, 2nd edn. Dunod, Paris.
- Leo, N. & Barker, S.C. (2002) Intra-genomic variation in ITS2 rDNA in the human louse: ITS2 is not suitable for phylogeographic studies of this species. *Insect Molecular Biology*, **11**, 651–657.
- Li, G.Q., Hu, Y.L., Kanu, S. & Zhu, X.O. (2003) PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Veterinary Parasitology*, **112**, 101–8.
- Meiswinkel, R. (1989) Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **56**, 23–39.

228 A. Perrin et al.

- Mellor, P.S. (1990) The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **162**, 143–161.
- Mellor, P.S. & Boorman, J. (1995) The transmission and geographical spread of African Horse sickness and Bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**, 1–15.
- Mellor, P.S. & Pitzolis, J. (1979) Observations and breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreaks of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, **69**, 229–234.
- Mellor, P.S. & Wittmann, E.J. (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Veterinary Journal*, **164**, 20–37.
- Mellor, P.S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307–340.
- Mo, C.L., Thompson, L.H., Homan, E.J., Oviedo, M.T., Greiner, E.C., Conzales, J. & Saenz, M.R. (1994) Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerica Bluetongue Team. *American Journal of Veterinary Research*, **55**, 211–215.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnet, F. (2003) Data analysis methods. *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants* (ed. by P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J. C. Glaszmann), pp. 43–76. Enfield Science Publisher, Montpellier, France.
- Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P. & Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews. Microbiology*, **3**, 171–81.
- Raich, T.J., Archer, J.L., Robertson, M.A., Tabachnick, W.J. & Beaty, B.J. (1993) Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *Journal of Medical Entomology*, **30**, 228–32.
- Ritchie, A., Blackwell, A., Malloch, G. & Fenton, B. (2004) Heterogeneity of ITS1 sequences in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Goetghbuere) suggests a population in Argyll, Scotland may be genetically distinct. *Genome*, **47**, 546–558.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Sarto i Montey, V., Ventura, D., Pages, N., Aranda, C. & Escosa, R. (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe; into Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, **1256**, 415–417.
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., de Santis, P. & Meiswinkel, R. (2003) Transmission of bluetongue virus in Italy. *Veterinary Record*, **152**, 119.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. (1994) Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Current Biology*, **4**, 77–783522.
- Sebastiani, F., Meiswinkel, R., Gomulski, L.M., Guglielmino, C.R., Mellor, P.S., Malacrida, A.R. & Gasperi, G. (2001) Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Dipt. Cerato.) inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, **10**, 1773–1786.
- Sendow, I., Sukarsih, S.E., Soleha, E., Pearce, M., Bahri, P.W. & Daniels, P.W. (1996) Bluetongue virus research in Indonesia. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific* ACIAR Proceedings No. 66 (ed. by T. D. George and P. Kegeo), pp. 28–32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Sukarsik, S.E., Daniels, P.W., Sendow, I. & Soleha, F. (1996) Longitudinal studies of *Culicoides* spp. associated with livestock in Indonesia. *Arbovirus Research in Australia* (ed. by M. F. Uren and B. H. Kay), pp. 203–209., CSIRO/QIMR, Brisbane, Australia.
- Tabachnick, W.J., Mellor, P.S. & Standfast, H.A. (1992) Working Team reports on vectors: recommendations for research on *Culicoides* vector biology. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (ed. by T.E. Walter and B. I. Osburn), pp. 977–981. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tabachnick, W.J., Robertson, M.A. & Murphy, K.E. (1996) *Culicoides variipennis* and bluetongue disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **791**, 219–226.
- Takamatsu, H., Mellor, P.S., Mertens, P.P., Kirkhorn, P.A., Burroughs, J.N. & Parkhouse, R.M. (2003) A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of General Virology*, **84**, 227–235.
- Tatem, A.J., Baylis, M., Mellor, P.S., Purse, B.V., Capela, R., Pena, I. & Rogers, P.J. (2003) Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. *Veterinary Microbiology*, **97**, 13–29.
- Tenenhaus, M. & Young, F.W. (1985) Analysis and synthesis of multiple correspondence analysis and others methods for quantifying categorical multivariate data. *Psychometrika*, **50**, 91–119.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1993) Treecon: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Computer Application in the Biosciences*, **9**, 177–182.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Van Dijk, A.A., Mellor, P.S. & Tabachnick, W.J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotype 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 378–395.
- Vogler, A.P. & Desalle, R. (1994) Evolution and phylogenetic information content of the ITS₁ region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 393–405.
- White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D. & Beaty, B.J. (2005) Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of General Virology*, **86**, 453–62.
- Wirth, W.W. & Marston, N.A. (1968) Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Annals of Entomological Society of America*, **61**, 783–784.
- Wittmann, E.J. & Baylis, M. (2000) Climate change: Effects on *Culicoides*. Transmitted viruses and implications for the UK. *Veterinary Journal*, **160**, 107–117.
- Wittmann, E.J., Mellor, P.S. & Baylis, M. (2001) Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique et Technique (OIE)*, **20**, 731–740.
- Zientara, S., Grillet, C. & de La Rocque, S. et al. (2001) La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001. *Epidémiologie en Santé Animale*, **40**, 129–137.

Accepted 21 December 2005

First published online 31 March 2006